

**Rekombinationsreaktionen zwischen dem oxidierten  
primären Donator, P700<sup>+</sup>, und den reduzierten  
Eisen-Schwefel-Zentren im Photosystem I**

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker  
**Rafael Jordan**

Von der Fakultät 2  
- Mathematik und Naturwissenschaften -  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-  
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Schomäcker

Berichter: Priv.-Doz. Dr. Schlodder

Berichter: Prof. Dr. Lubitz

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2001

Berlin 2001

D 83

**Jordan, Rafael**

**Rekombinationsreaktionen zwischen dem oxidierten primären Donator, P700<sup>+</sup>, und den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren im Photosystem I**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ladungsrekombination zwischen dem oxidierten Elektronendonator, P700<sup>+</sup>, und den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren, (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> bzw. (F<sub>A</sub><sup>-</sup>F<sub>B</sub><sup>-</sup>), untersucht. Als Methode wurde die blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektroskopie eingesetzt. Redox titrationen wurden zusätzlich mit Hilfe der EPR durchgeführt.

Unterschiedliche Ansätze wurden ausgeführt, um die Kinetik der Ladungsrekombination zwischen P700<sup>+</sup> und (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> zu analysieren. Die Untersuchungen wurden dadurch erschwert, daß in Konkurrenz zur Rekombination ein Vorwärtselektronentransfer von den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren zu einem unbekannten Akzeptor erfolgt. Durch gezielte Reduktion dieses Akzeptors bei einem Potential von -250 mV und durch Berechnung des Zeitverlaufes der Absorptionsänderung nach Blitzlichtanregung in Gegenwart von Akzeptoren und Donatoren konnte eine Halbwertszeit für die Rekombination von (95 ± 10) ms bestimmt werden. Eine Verringerung des Redoxpotentials führt zur einfachen Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren, so daß nach Blitzlichtanregung die Rekombination zwischen P700<sup>+</sup> und (F<sub>A</sub><sup>-</sup>F<sub>B</sub><sup>-</sup>) mit einer Halbwertszeit von (10 ± 3) ms beobachtet werden kann. Werden die Eisen-Schwefel-Zentren bei ca. -590 mV doppelt reduziert, erfolgt nach Blitzlichtanregung die Rekombination von P700<sup>+</sup>(A<sub>1</sub>F<sub>X</sub>)<sup>-</sup> (F<sub>A</sub><sup>-</sup>F<sub>B</sub><sup>-</sup>) mit einer Halbwertszeit von (275 ± 25) µs.

Um die Energetik der Reaktion zu bestimmen, wurden die Halbstufenpotentiale für die Oxidation des primären Elektronendonators und für die Reduktion der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren gemessen. Aus den Messungen an PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii* folgt ein Halbstufenpotential von (440 ± 10) mV für die Oxidation von P700. Untersuchungen an PS I-Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii*, bei denen die axialen Liganden Histidin A676 und Histidin B656 durch verschiedene Aminosäuren substituiert wurden, haben gezeigt, daß das Halbstufenpotential sich um bis zu +140 mV verschiebt.

Die Halbstufenpotentiale für die ein- und zweifache Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren, (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)/(F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> und (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup>/(F<sub>A</sub><sup>-</sup>F<sub>B</sub><sup>-</sup>), werden mit (-440 ± 10) mV und (-465 ± 10) mV bestimmt. Dazu wurden die Beiträge der oben genannten Ladungsrekombinationsreaktionen zu der blitzinduzierten Absorptionsänderung in Abhängigkeit des Redoxpotentials analysiert. Diese Ergebnisse werden qualitativ mit Hilfe von EPR-Messungen überprüft und im Zusammenhang mit den untereinander stark abweichenden Daten aus der Literatur diskutiert.

Die Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Rekombination zwischen P700<sup>+</sup> und (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> ergibt (220 ± 10) meV und eine maximale Rate von (44 ± 10) · 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse erfolgt eine Zuordnung, auf welchem Wege der Zustand P700<sup>+</sup>(F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> rekombiniert. Sowohl die direkte Rekombination, als auch die Rekombination über das F<sub>X</sub> sind aufgrund des großen Abstandes der Eisen-Schwefel-Zentren zum P700<sup>+</sup> und der daraus resultierenden sehr langsamen Ratenkonstanten für die Rekombination auszuschließen. Die Rekombination über den Zustand P700<sup>+</sup>A<sub>0</sub><sup>-</sup> ist aufgrund der zu geringen Aktivierungsenergie nicht möglich. Nimmt man den Zustand P700<sup>+</sup>A<sub>1</sub><sup>-</sup> als Zwischenstufe an, stimmen die ermittelte Energetik und Kinetik der Rekombination zwischen P700<sup>+</sup> und (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> gut mit den aus der Literatur bekannten Daten für den Zustand P700<sup>+</sup>A<sub>1</sub><sup>-</sup> überein.

Abschließend werden Untersuchungen zur Aktivität von kristallisierten Photosystemen beschrieben. Diese haben gezeigt, daß die Aktivität von kristallisiertem PS I und PS II mindestens so hoch ist wie bei gelösten Komplexen. Zusätzlich wurde im PS II die Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Blitzzahl für bis zu 10000 Blitze bestimmt. Daraus hat sich ergeben, daß kristallines PS II stabiler ist als PS II-Komplexe in Lösung.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikationen:

1. A.N. Webber, H. Su, S.E. Bingham, H. Käß, L. Krabben, M. Kuhn, R. Jordan, E. Schlodder, and W. Lubitz  
**Site-Directed Mutations Affecting the Spectroscopic Characteristics and Midpoint Potential of the Primary Donor in Photosystem I**  
Biochemistry, 35, 12857-12863 (1996)
2. R. Jordan, U. Nessau, and E. Schlodder  
**Charge Recombination between the Reduced Iron-Sulphur Clusters and P700<sup>+</sup>**  
in: Photosynthesis: Mechanisms and Effects (G. Garab, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. I, 663-666 (1998)
3. C. Schulz, F. Müh, A. Beyer, R. Jordan, E. Schlodder, and W. Lubitz  
**Investigation of *Rhodobacter sphaeroides* Reaction Center Mutants with Changed Ligands to the Primary Donor**  
in: Photosynthesis: Mechanisms and Effects (G. Garab, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. II, 767-770 (1998)
4. L. Krabben, E. Schlodder, R. Jordan, D. Carbonera, G. Giacometti, H. Lee, A.N. Webber, and W. Lubitz  
**Influence of the Axial Ligands on the Spectral Properties of P700 of Photosystem I : A Study of Site-Directed Mutants**  
Biochemistry, 39, 13012-13025 (2000)
5. A. Zouni, R. Jordan, E. Schlodder, P. Fromme, and H.T. Witt  
**First photosystem II crystals capable of water oxidation**  
Biochimica et Biophysica Acta, 1457, 103-105 (2000)

Tagungsbeiträge

1. R. Jordan, U. Nessau und E. Schlodder  
**Ladungsrekombination von P700<sup>+</sup> mit den reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren**  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Universität Leipzig  
(Präsentation, 1996)
2. R. Jordan, U. Nessau, and E. Schlodder  
**Charge Recombination between the Reduced Iron-Sulphur Clusters and P700<sup>+</sup>**  
11th International Congress on Photosynthesis, Budapest, Ungarn (Präsentation, 1998)

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Photosynthese</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Lokalisation des Photosyntheseapparates	2
1.1.3 Photosynthetisch aktive Pigmente und ihre Funktion	5
<b>1.2 Das Photosystem I in Cyanobakterien</b>	<b>6</b>
1.2.1 Struktur	6
1.2.2 Funktion	9
1.2.3 Kinetik und Energetik	10
<b>2 Problemstellung</b>	<b>13</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 PS I-Komplexe aus <i>Synechococcus elongatus naeglii</i>	14
3.2 Zeitaufgelöste Absorptionsdifferenzspektroskopie	14
3.3 EPR-Messungen	17
3.4 Elektrochemische Methoden	22
3.5 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration	26
3.6 Einstellung der Temperatur	28
3.7 Präparation Organischer Gläser	29
<b>4 Kinetiken der Rekombinationsreaktionen</b>	<b>31</b>
4.1 Einführung	31
4.2 Ergebnisse und Diskussion	33
4.2.1 Kinetik der Rekombination von $P700^+$ mit $(F_A F_B)^-$	33
4.2.1.1 PS I in wäßriger Lösung	33
4.2.1.2 PS I im organischen Glas	40
4.2.1.3 Diskussion	43
4.2.2 Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	48
4.2.3 Änderung der Rekombinationskinetiken in Abhängigkeit des Redoxpotentials	52
4.2.3.1 Absorptionsdifferenzspektrum für die Rekombination von $P700^+$ mit $(F_A F_B)^-$	53
4.2.3.2 Zuordnung der gefundenen Rekombinationskinetiken und Diskussion	56

<b>5 Halbstufenpotentiale der einfach und doppelt reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren <math>(F_A F_B)^{\cdot-}</math> und <math>(F_A^{\cdot-} F_B^{\cdot-})</math></b>	<b>58</b>
<b>5.1 Einführung</b>	<b>58</b>
<b>5.2 Ergebnisse</b>	<b>59</b>
5.2.1 Äquilibrierungszeiten	59
5.2.2 Redox titrationen von <i>Synechococcus elongatus</i>	61
5.2.2.1 Überprüfung der Redox titrationen mit Hilfe der EPR	62
5.2.2.2 Untersuchung der bei stark reduzierenden Bedingungen verbleibenden 10 ms Kinetik	68
<b>5.3 Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>6 Aktivierungsenergie für die Ladungsrekombinationsreaktion <math>P700^+</math> mit <math>(F_A F_B)^{\cdot-}</math></b>	<b>72</b>
<b>6.1 Einführung</b>	<b>72</b>
<b>6.2 Ergebnisse</b>	<b>74</b>
6.2.1 Messungen im Temperaturbereich von 315 K bis 275 K	74
6.2.1.1 Temperaturabhängigkeit unter schwach reduzierenden Bedingungen	74
6.2.1.2 Temperaturabhängigkeit unter Verwendung eines Donators	75
6.2.2 Einfluß von Gefrierschutzmitteln auf die Rekombinationsreaktion bei Raumtemperatur	76
<b>6.3 Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>7 Untersuchungen der Halbstufenpotentiale des primären Donators und deren Beeinflussungen durch Punktmutationen</b>	<b>88</b>
<b>7.1 Einleitung</b>	<b>88</b>
<b>7.2 Halbstufenpotential vom <math>P700/P700^+</math> in <i>Synechococcus elongatus</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>88</b>
<b>7.3 Halbstufenpotential vom <math>P/P^+</math> in <i>Rhodobacter sphaeroides</i></b>	<b>91</b>
<b>8 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinen Systemen</b>	<b>94</b>
<b>8.1 Einleitung</b>	<b>94</b>
<b>8.2 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinem PS I</b>	<b>94</b>
<b>8.3 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinen PS II</b>	<b>95</b>
<b>9 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>98</b>
<b>10 Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>102</b>
<b>11 Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Photosynthese

### 1.1.1 Einführung

Die Photosynthese ist der wichtigste biologische Prozeß der Energieumwandlung, bei dem Sonnenenergie in Form von chemischen Verbindungen gespeichert wird. Die größte Bedeutung hat heute die oxygene Photosynthese, bei der Wasser oxidiert und Sauerstoff freigesetzt wird. Sie existiert bereits etwa 3.5 Milliarden Jahre, wie an Hand von fossilen Cyanobakterien nachgewiesen wurde. Höhere Pflanzen, Algen und Prochlorophyten sind ebenfalls zur oxygenen Photosynthese fähig. Neben der oxygenen Photosynthese existiert auch die evolutionär gesehen ältere anoxygene Photosynthese. Im Gegensatz zu den wasserspaltenden Organismen besitzen die anoxygenen Bakterien nur ein Photosystem. Dies reicht für die Oxydation der benötigten Elektronendonatoren wie  $\text{H}_2\text{S}$  ( $E_m = +0.141 \text{ mV}$ ) und organischen Substanzen aus. Für die Spaltung des Wassers hat die Evolution Organismen mit zwei in Reihe geschalteten Photosystemen hervorgebracht, die mit  $E_m = +1.12 \text{ V}$  [1] ein ausreichend positives Potential erzeugen, um Wasser zu oxidieren.

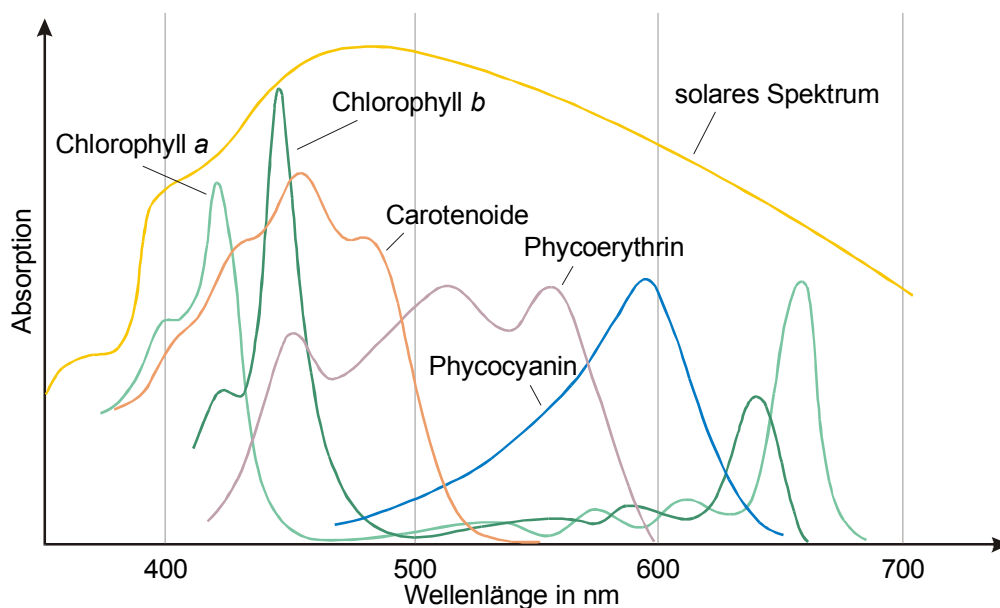


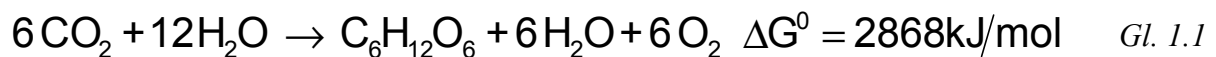
Abb. 1.1: Absorptionsspektren verschiedener photosynthetischer Pigmente nach [2]

Die Anfänge der Photosyntheseforschung liegen am Beginn des 18. Jahrhunderts, als erstmalig festgestellt wurde, daß Pflanzen unter Belichtung ein für das Überleben einer Maus notwendiges Gas herstellen. Dabei nehmen sie ein Gas aus der Atmosphäre auf, das bei der tierischen Atmung freigesetzt wird. 1888 erfolgte der Nachweis, daß Sauerstoff in den

Chloroplasten erzeugt wird und mit Hilfe von aerophilen Bakterien konnte das erste Aktionspektrum der Photosynthese aufgenommen werden. Ende des 18. Jahrhunderts wurde dann vermutet, daß der Kohlenstoff aus dem CO<sub>2</sub> mit Wasser reagiert und so Sauerstoff freigesetzt wird. Erst 1941 konnte mit Hilfe von Sauerstoffisotopen nachgewiesen werden, daß der Sauerstoff aus der Zersetzung des Wassers stammt und das Kohlendioxid mit dem Wasserstoff des Wassers in Kohlenhydrate umgewandelt wird. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Reaktionsfolge bei der Photosynthese von der Lichtabsorption bis zur Bildung von Kohlenhydraten auf molekularer Ebene erforscht.

Abb. 1.1 zeigt die Absorptionsspektren der wichtigsten photosynthetischen Pigmente im Vergleich zum solaren Spektrum. Dies zeigt, daß die Evolution Pigmente für die Photosynthese hervorgebracht hat, die fast im gesamten Sonnenemissionsspektrum absorbieren.

Die chemische Bruttobilanz des endergonischen Prozesses der oxygenen Photosynthese lautet:



Der Mensch, wie auch die Tierwelt, erhält durch diese gespeicherte Form der Energie die Lebensgrundlage. Eine Notwendigkeit stellt die Fauna für die Flora nicht dar, da der Zyklus über den Aufbau der Pflanzen, unter Herstellung von Zuckern und Sauerstoff und deren Verwesung, unter Freisetzung von Wasser und Kohlendioxid prinzipiell geschlossen ist.

### 1.1.2 Lokalisation des Photosyntheseapparates

Die Photosynthese findet bei Eukaryonten (Algen und höheren Pflanzen) in speziellen, membranreichen Zellorganellen, den Chloroplasten (siehe Abb. 1.3, Seite 4) statt. Chloroplasten haben eine äußere Membran, die durch einen schmalen Intermembranraum von der inneren Membran getrennt ist. Die innere Hüllmembran umschließt das Stroma, eine wäßrige Lösung von Enzymen des Calvinzyklus, Enzymen der Nitrit- und Sulfatreduktion, Chloroplasten-DNA, tRNA, mRNA und Ribosomen, über die die chloroplastencodierten Proteine synthetisiert werden, sowie Plastoglobuli und Stärke. Im Stroma findet die vom Licht unabhängige Dunkelreaktion statt, bei der unter Verbrauch von NADPH und ATP CO<sub>2</sub> mit Wasser als Kohlenhydrat fixiert wird [2]. In das Stroma eingebettet liegt die Thylakoidmembran. Sie besteht aus einer einzigen stark gefalteten Membran, die die wäßrige Innenphase, das Thylakoidlumen, umschließt. Ein Teil dieser Thylakoidmembran besteht aus diskusförmigen, gestapelten Strukturen, die als Granastapel bezeichnet werden. Die Membranverbindungen zwischen den Grana werden Stromalamellen genannt.

In der Thylakoidmembran finden die lichtabhängigen Primärprozesse der Photosynthese statt, bei denen mit der Energie des Sonnenlichtes NADPH und ATP erzeugt wird. Die für die Lichtreaktion wichtigen Proteine sind in der Thylakoidmembran eingebettet: Das Photosystem II mit dem manganhaltigen Wasserspaltungskomplex, das Photosystem I, der Cytochrom- $b_6f$ -FeS-Komplex und die ATP-Synthase (siehe Abb. 1.3). Diese drei Proteine und die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase sind durch bewegliche Redoxkomponenten miteinander verbunden: Plastochinon (PQ-Pool), Plastocyanin (PC) (in Cyanobakterien das Cytochrom  $c_6$ , hier nicht abgebildet) und Ferredoxin ( $F_d$ ). Die zwei hintereinander geschalteten Photosysteme liefern die notwendige Potentialdifferenz, um Wasser zu spalten und die Elektronen zum NADP<sup>+</sup> zu transferieren.

In prokariotischen Cyanobakterien finden die Reaktionen der Photosynthese nicht in speziellen Zellorganellen, sondern an der inneren Zellmembran statt (siehe Abb. 1.2). Eine Abbildung des Aufbaus eines Cyanobakteriums ist in Referenz [3] zu finden. Auch Cyanobakterien sind in der Lage, Wasser zu spalten und Sauerstoff freizusetzen. Ihr Photosyntheseapparat ist dem der höheren Pflanzen sehr ähnlich. Die Chloroplasten höherer Pflanzen gingen aus Vorläufern der Cyanobakterien hervor, die in enger Symbiose mit nicht photosyntheseaktiven Eukaryonten lebten (Endosymbiontentheorie) [2]. Aufgrund ihrer hohen Stabilität unter den benötigten Meßbedingungen eignen sich aus Cyanobakterien gewonnene Komponenten der Photosynthese gut für wissenschaftliche Untersuchungen.

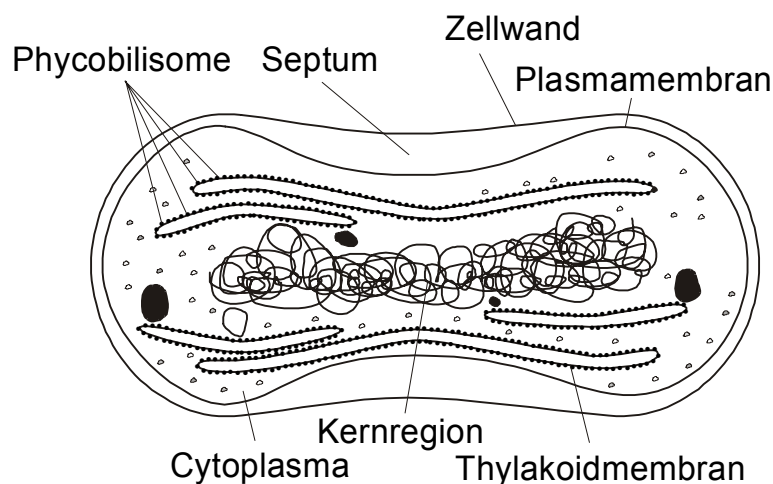
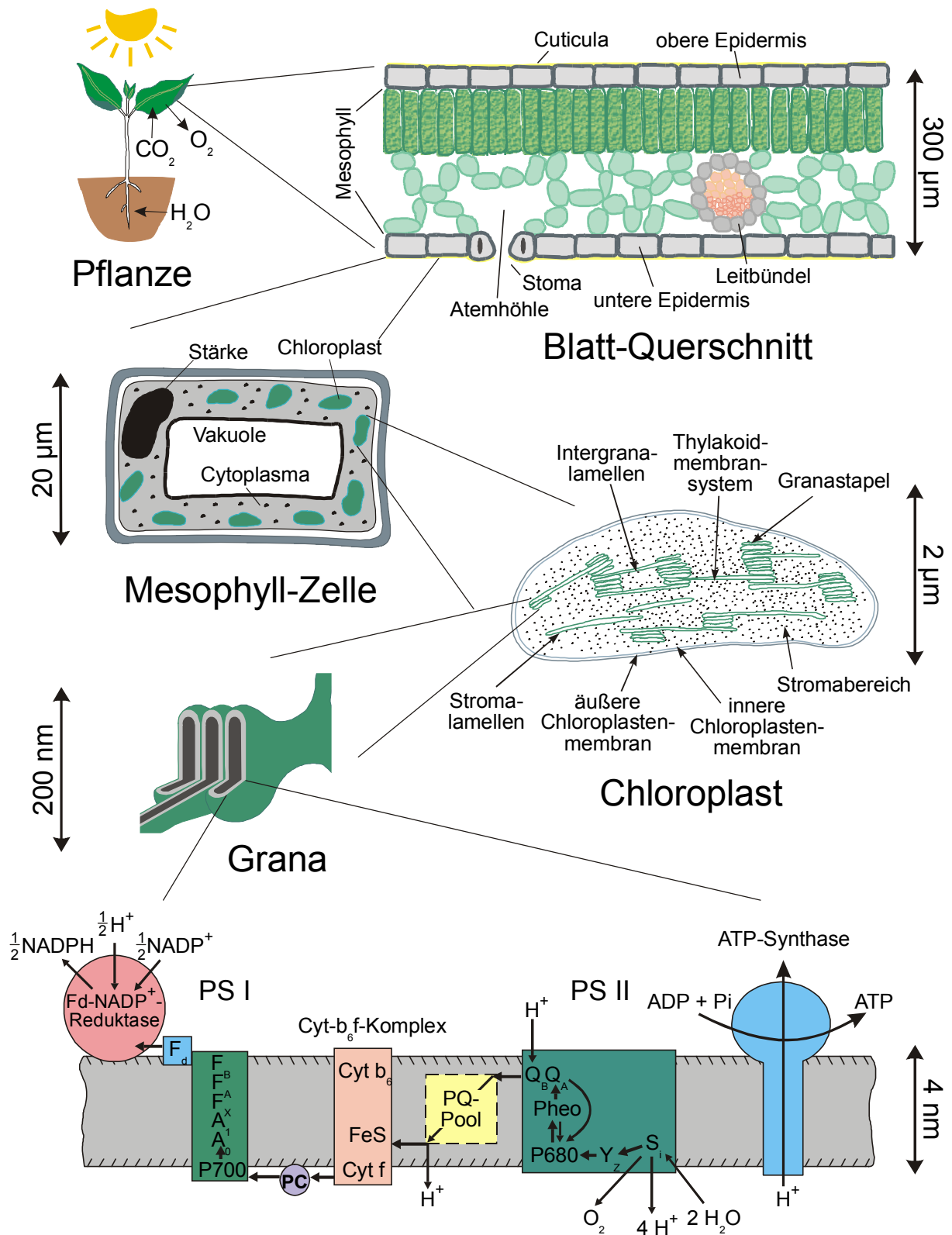


Abb. 1.2: Schema eines Cyanobakteriums





## Thylakoidmembran mit Pigment-Protein-Komplexen

Abb. 1.3: Lokalisation der Photosynthesekomponenten Fd-NAPD<sup>+</sup>-Reduktase, Photosystem I (PS I), Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplex, Plastochinonpool (PQ-Pool), Photosystem II (PS II) und ATP-Synthase sowie Elektronen-/Protonenfluß in der Thylakoidmembran. Dargestellt sind ferner die Membranstapel (Grana) in Chloroplasten und ein Blattquerschnitt.

### 1.1.3 Photosynthetisch aktive Pigmente und ihre Funktion

Das wichtigste Photosynthese-Pigment ist das Chlorophyll, ein Tetrapyrrol-Ringsystem mit einem  $Mg^{2+}$  als Zentralatom. Abhängig von den Substituenten des Tetrapyrrol-Ringsystems unterscheidet man vier Chlorophylle. Sauerstoffentwickelnde Organismen (höhere Pflanzen, Algen und Cyanobakterien) besitzen immer Chlorophyll a (*Chl a*, Abb. 1.4). Zusätzlich kommt Chlorophyll b (*Chl b*) in höheren Pflanzen, Chlorophyll c in Braunalgen und Chlorophyll d in Rotalgen vor.

Die Absorption der Chlorophylle im blauen und roten Spektralbereich beruht auf  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergängen des ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystems. Während *Chl a* in acetonischer Lösung bei 664 nm und 430 nm Absorptionsmaxima aufweist, verschieben sich diese infolge der Formylgruppe im *Chl b* nach 642 nm bzw. 453 nm. Aufgrund der unterschiedlichen Lage der Absorptionsbanden führt dies zu einer besseren spektralen Ausnutzung des Sonnenlichtes. Der Bereich, in dem die Chlorophyll-Moleküle absorbieren, wird zusätzlich durch den unterschiedlichen Einfluß der jeweiligen molekularen Umgebung im Protein auf das  $\pi$ -Elektronensystem jedes einzelnen Chlorophyll-Moleküls erweitert.

Ebenso tragen Karotinoide und Phycobiline zur effektiven Ausnutzung des gesamten Spektrums des Sonnenlichtes bei. Die Karotinoide sind gelb- oder orangefarbige langkettige Tetraterpene. Das Absorptionsspektrum der Karotinoide zeigt meistens drei Banden mit einem charakteristischen Abstand von ungefähr 30 nm. In höheren Pflanzen und Grünalgen erfolgt der Transfer der Anregungsenergie von den Karotinoiden zum Reaktionszentrum mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 40 % bis 90 %.

Neben der Antennenfunktion schützen Karotinoide vor der photooxidativen Zerstörung der Chlorophylle. Gehen Chlorophylle, z.B. bei sehr starker Belichtung, in den Triplettzustand über, würden sie mit dem Triplett-Sauerstoff der Luft reagieren und durch den resultierenden Singulett-Sauerstoff zerstört werden. In Anwesenheit von Karotinoiden hingegen wird der Triplettzustand auf diese transferiert, wo er strahlungslos abgebaut wird.

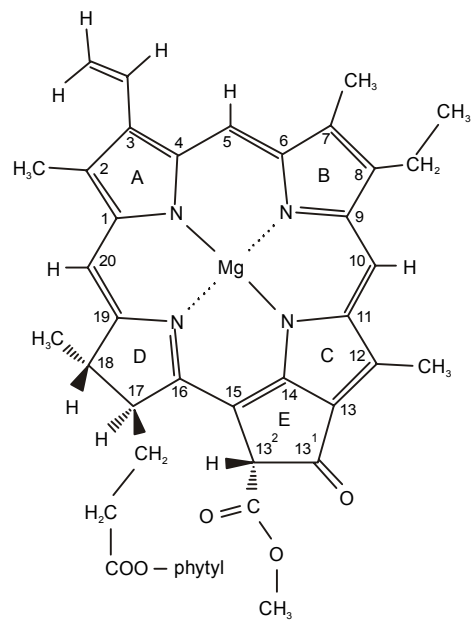


Abb. 1.4:  
Struktur von Chlorophyll a

## 1.2 Das Photosystem I in Cyanobakterien

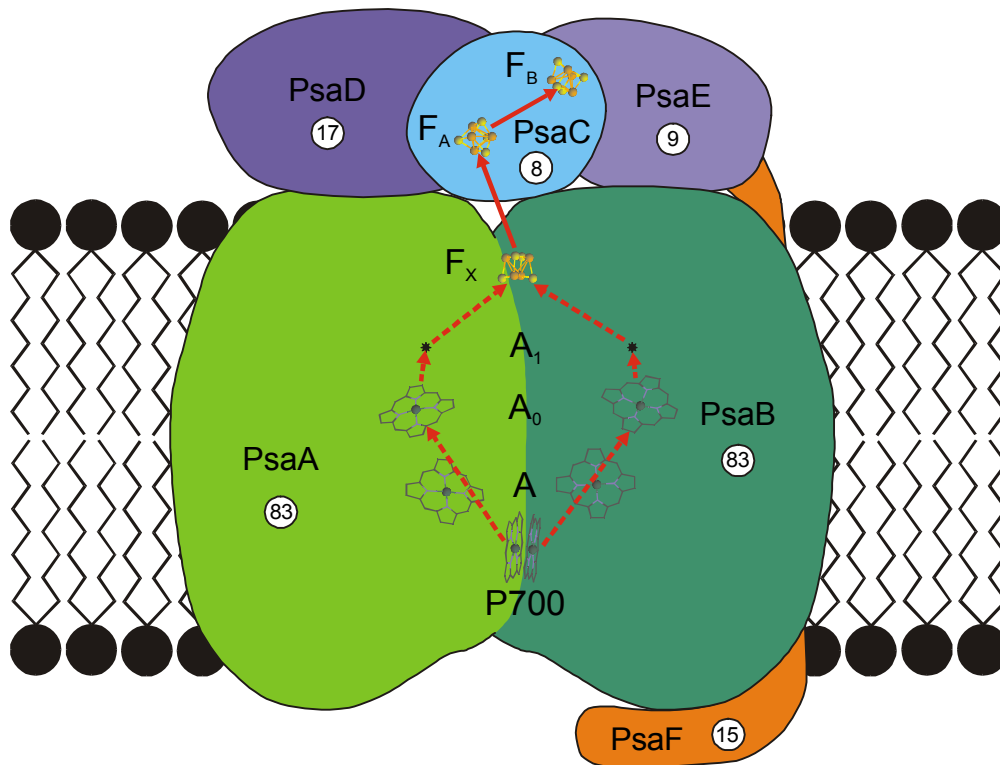


Abb. 1.5: Schema des Photosystems I mit einem Teil der Untereinheiten und den für die Photosynthese relevanten Kofaktoren

*PsaA bis PsaF bezeichnen die nach ihren korrespondierenden Genen benannten Untereinheiten und die Zahlenwerte ihre Masse in kDa, die Bezeichnungen  $F_A$ ,  $F_B$  und  $F_X$  stehen für jeweils ein [4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Zentrum, A und  $A_0$  für jeweils zwei monomere Chlorophylle,  $A_1$  für zwei Phyllochinone und P700 für den primären Elektronendonator, ein dimeres Chlorophyll*

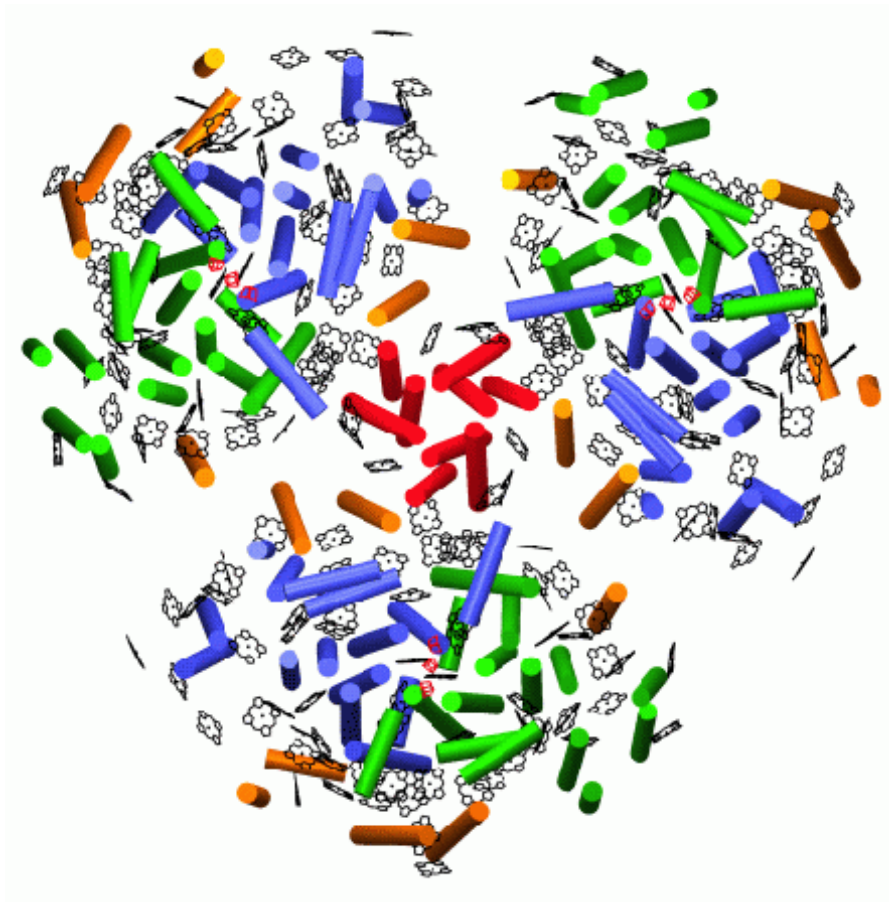
### 1.2.1 Struktur

Der monomere PS I-Komplex in Cyanobakterien besteht aus den zwei Hauptuntereinheiten PsaA und PsaB (die Bezeichnung erfolgt nach den korrespondierenden Genen), die ein Heterodimer bilden (jedes ~ 83 kDa) und mindestens neun weiteren Untereinheiten mit einem Molgewicht < 20 kDa [5]. Die beiden Hauptuntereinheiten erstrecken sich mit jeweils 11 transmembranen  $\alpha$ -Helices über die gesamte Membran [4] und binden neben dem Hauptteil der Elektronentransferkomponenten (siehe Kapitel 1.2.2) auch nicht-kovalent Antennenchlorophylle (*Chl a*) und Karotine. Man bezeichnet diese Ansammlung von Pigmenten auch als "core"-Antenne [5, 6].

Eine schematische Darstellung des Photosystems I mit seinen Proteinuntereinheiten ist in Abb. 1.5 zu sehen. Die Kofaktoren sind entsprechend der durch Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 4.5 Å ermittelte Anordnung ihrer geometrischen Zentren [4] abgebildet. Die kleineren Untereinheiten werden wie die Hauptuntereinheiten nach ihren korrespondierenden Genen mit PsaC bis PsaM benannt. Bei den Untereinheiten PsaC, PsaD und PsaE handelt es sich um extrinsische hydrophile Proteine [7], die stromaseitig an das Heterodimer gebunden sind. Das Protein PsaC trägt von den Kofaktoren der Elektronentransferkette die terminalen Akzeptoren  $F_A$  und  $F_B$ . Die Untereinheit PsaF ist das einzige lumenseitige Protein. Es ist wahrscheinlich mit einer oder mehreren hydrophoben Helices in der Thylakoidmembran verankert [8]. Die Untereinheiten PsaI, PsaJ und PsaM sind kleine hydrophobe Proteine, die aus jeweils einer membranintrinsischen  $\alpha$ -Helix bestehen [5, 8]. Die PsaK und PsaL Proteine haben wahrscheinlich jeweils zwei transmembrane  $\alpha$ -Helices [5, 8].

Die meisten der hier genannten  $\alpha$ -Helices sind fast parallel zueinander in einer etwa 40 Å dicken Schicht angeordnet und in die Thylakoidmembran eingebettet. Dieses Feld von transmembranen  $\alpha$ -Helices gliedert sich in unterschiedliche Domänen [9] (siehe Abb. 1.6): eine kleine, die nahe der kristallographischen dreizähligen Achse liegt und drei große gleichartige Domänen, die drei monomeren PS I-Komplexen zugeordnet werden. Die kleine Gruppe wirkt als „Connection Domain“ für die monomeren PS I-Komplexe. Dies ist in Übereinstimmung mit der schon 1987 durch Elektronenmikroskopie nachgewiesenen trimeren Form von PS I-Komplexen [10]. Vermutlich liegt in vivo ebenfalls diese trimere Form des PS I als Bestandteil der Membran vor [11, 12].

Weiterhin besteht die Möglichkeit, den trimeren PS I-Komplex durch Präparationsmethoden in drei Monomere zu zerlegen [13]. PS I wird in diesem Fall aus dem *Synechococcus elongatus* WT in trimere Form isoliert. Während der anschließenden Gelfiltration dissoziieren die Trimere in Monomere, vermutlich durch eine Änderung des osmotischen Druckes innerhalb des Trimers.



*Abb. 1.6: Schematische Darstellung der transmembranen  $\alpha$ -Helices eines PS I-Trimers, aller "core"-Antennen und den Kofaktoren der Elektronentransferkette [14].*

*Die zu den großen Untereinheiten PsaA und PsaB gehörenden  $\alpha$ -Helices sind blau und grün dargestellt, die  $\alpha$ -Helices der kleinen Untereinheiten PsaF, PsaJ, PsaK und PsaM orange. Die in rot dargestellten  $\alpha$ -Helices von PsaI und PsaL spielen bei der Trimerisierung eine besondere Rolle.*

### 1.2.2 Funktion

Aufgrund der enzymatischen Funktion kann man das Photosystem I als lichtgetriebene Cytochrom  $c_6$ -(Plastocyanin):Ferredoxin-Oxidoreduktase ansehen. Der Prozeß kann in drei Teile zerlegt werden: Absorption des Photons, Transfer der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum, primäre Ladungstrennung und Stabilisierung der Ladungstrennung durch eine Reihe von weiteren Elektronentransferschritten (siehe Übersichtsartikel [5, 15 - 18]).

Die auftreffenden Photonen werden von den Antennenpigmenten absorbiert, die dabei in einen angeregten Singulettzustand übergehen. Die Anregungsenergie wird über Excitonentransfer auf den primären Elektronendonator des Photosystems I (P700) übertragen. Das P700 ist ein Dimer aus zwei *Chl a*-Molekülen (Abb. 1.5). Nach Anregung überträgt P700 ein Elektron zum ersten Akzeptor  $A_0$  (ein monomeres Chlorophyllmolekül). Damit wird die optische Anregungsenergie in die elektrochemische Energie des Redoxpaares  $P700^+/A_0^-$  /  $P700/A_0$  umgewandelt. Um den so entstandenen ladungsgetrennten Zustand zu stabilisieren und eine Ladungsrekombination zu verhindern, wird das Elektron schnell zum zweiten Elektronenakzeptor  $A_1$  (ein Phyllochinon, Vitamin  $K_1$ ) weitertransportiert. Die Phyllochinone wurde erst 1999 eindeutig in dem Strukturmodell identifiziert [7]. Da die Kofaktoren  $A_0$  und  $A_1$  doppelt angelegt sind, bestehen für das Elektron theoretisch zwei Zweige, auf denen es transferiert werden kann. Zur Zeit ist noch ungeklärt, über welchen der in Abb. 1.5 gezeigten Pigmentzweige der Elektronentransport vom P700\* zum  $F_X$  verläuft. Vermutungen gehen sogar dahin, daß beide Wege gleichermaßen genutzt werden [19, 20]. Von  $A_1^-$  wird das Elektron auf  $F_X$ , ein [4Fe-4S] Eisen-Schwefel-Cluster [21, 22], übertragen. Vom reduzierten  $F_X$  gelangt das Elektron nacheinander zu den terminalen [4Fe-4S]-Clustern,  $F_A$  und  $F_B$ , die als einzige Kofaktoren auf der Untereinheit PsaC lokalisiert sind.

### 1.2.3 Kinetik und Energetik

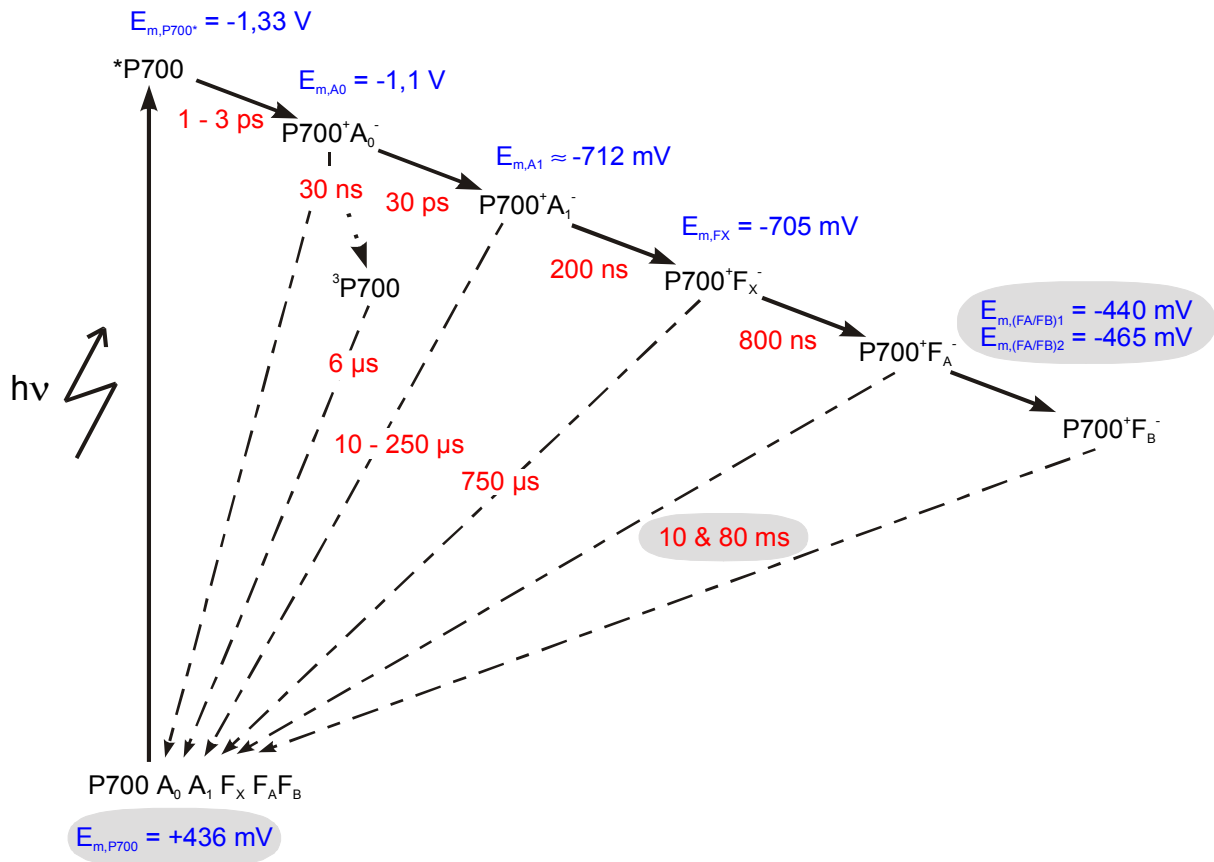


Abb. 1.7: Bekannte Kinetiken des Vorwärtstransfers, sowie der Rekombinationen und Halbstufenpotentiale im Photosystem I  
 rot: Halbwertszeiten für den Elektronenvorwärtstransfer und die Rekombination  
 blau: Halbstufenpotentiale der Kofaktoren  
 Bei den grau unterlegten Werten handelt es sich um Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit

Abb. 1.7 zeigt mit den durchgezogenen Pfeilen den natürlich stattfindenden Weg des Elektronentransfers. Während es lange Zeit umstritten war, ob das Elektron zunächst vom  $\text{F}_B$  zum  $\text{F}_A$  oder umgekehrt transferiert wird, scheint es in jüngster Zeit erwiesen, daß der Transfer über das  $\text{F}_A$  zum  $\text{F}_B$  erfolgt [23, 24]. Die gestrichelten Pfeile symbolisieren die einzelnen Rekombinationswege. Ladungsrekombinationen treten auf, wenn der Vorwärtselektronentransfer durch Vorreduktion oder Extraktion nachfolgender Akzeptoren unterbrochen wird. Die in Abb. 1.7 gezeigten Halbwertszeiten und Halbstufenpotentiale sind nur ein Anhaltspunkt. Die in der Literatur beschriebenen Resultate streuen in einem weiten Bereich um diese Werte. Eine ausführliche Diskussion der Gründe für die Streuung der Werte und welche Halbstufenpotentiale am wahrscheinlichsten sind, ist im Übersichtsartikel von K. Brettel [104] enthalten. Die folgenden Werte für die Halbstufenpotentiale und die Rekombinations-

kinetiken weichen von [104] ab. Es wurden eigene Ergebnisse verwendet, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind:

- Das Halbstufenpotential für das  $P700/P700^+$  wird nach eigenen Messungen mit +436 mV zugrunde gelegt [119]. Aus dem Halbstufenpotential von  $P700/P700^+$  und der Energie des absorbierten Photons mit 700 nm (1.77 V) resultiert dann für das  $P700^*$  ein Energieniveau von -1.33 V.
- Messungen der Ladungsrekombinationen von  $P700^+$  mit  $(F_A F_B)^-$  bzw.  $(F_A^- F_B^-)$  ergaben Halbwertszeiten von 80 ms bzw. 10 ms [25].
- Die Halbstufenpotentiale für die einfache und doppelte Reduktion der beiden terminalen Eisen-Schwefel-Zentren wurde mit -440 mV und -465 mV bestimmt [26].

Unterschiedliche Halbwertszeiten zwischen 30 ms und 100 ms findet man in der Literatur für die Ladungsrekombination des Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$  [27 - 30, 71, 72]. Es gibt jedoch keine Arbeit, in der nach Blitzanregung nur die Bildung und die Rekombination des Ladungstrennten Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$  beobachtet wurde, ohne daß konkurrierende Reaktion (Abgreifen bzw. Einspeisen von Elektronen auf der Akzeptor- bzw. Donatorseite) auftraten. Eine detaillierte Analyse der Ladungsrekombination und der auftretenden Konkurrenzreaktionen war daher eines der Ziele dieser Arbeit.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion  $P700^+(F_A F_B)^- \rightarrow P700(F_A F_B)$  wurden im Wesentlichen nur zwei Arbeiten publiziert, die mit den Werten 460 meV [31] und 200 meV [32] zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Der Wert aus der ersten Arbeit spricht für eine Rekombination des ladungstrennten Zustandes  $P700^+ F_A^-$  über das Zwischenprodukt  $P700^+ A_0^-$ , der der zweiten über das Zwischenprodukt  $P700^+ A_1^-$ .

Halbstufenpotentiale für die Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren sind in der Vergangenheit in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden. Sie sind in Tabelle 1.1 chronologisch zusammengefaßt. Die Ergebnisse von EPR-Messungen [34, 36, 38, 39, 40, 42, 43] stimmen mit einer Ausnahme untereinander relativ gut überein. Diese Untersuchungen sind jedoch bei 15 K bis 20 K, d.h. bei sehr niedrigen Temperaturen, durchgeführt worden, was die Meßergebnisse durch Strukturänderungen des Proteins und deren Einfluß auf das Redoxpotential von  $F_A$  bzw.  $F_B$  verfälschen kann, wie im Kapitel 5.3 zu den Redoxmessungen zu diskutieren sein wird. Optische Untersuchungen bei Raumtemperatur [33, 41] haben ca. 60 mV positivere Werte ergeben. Das dies nicht nur an den optischen Methoden liegen



muß, zeigen optische Tieftemperaturmessungen [35, 37], deren Werte wiederum deutlich negativer sind.

$\frac{E_{m1}}{\text{mV}}$	$\frac{E_{m2}}{\text{mV}}$	Methode	Signal	Spezies	Art der Probe	Jahr	Ref.
-470		optisch	$\Delta A$ 430 nm bei RT	<i>Spinat</i>	Digitonin PS I Partikel	1972	[33]
-530	<-580	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	Digitonin PS I Partikel	1973	[34]
-530		optisch	$\Delta A$ P700 bei 77 K	<i>Spinat</i>	Chloroplasten	1974	[35]
-553	-594	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	Chloroplasten	1974	[36]
-530		EPR/optisch	$\Delta A$ P700 bei 15 K	<i>Spinat</i>	PS I Partikel	1977	[37]
-550	-585	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	Triton PS I Partikel	1978	[38]
-540	-590	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	Triton PS I	1980	[39]
-510	-545	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	Triton PS I in Glycerin	1980	[39]
-518	-543	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Dunaliella</i>	Membranen	1981	[40]
-500		optisch	$\Delta A$ P700 bei RT	<i>Spinat</i>	Triton PS I Partikel	1987	[41]
-470	-560	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	PsaC Untereinheit	1991	[42]
-510		EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Spinat</i>	PsaC Untereinheit	1992	[43]
-446	-501	EPR	$F_A$ , $F_B$ Resonanz	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	PS I analoge bRCs	1997	[44]

*Tabelle 1.1: In der Literatur beschriebene Halbstufenpotentiale für die terminalen Eisen-Schwefel-Zentren im Photosystem I in chronologischer Ordnung*

*$E_{m1}$  und  $E_{m2}$  werden meist den Halbstufenpotentialen für  $F_B^-$  und  $F_A^-$  zugeordnet. Das diese Zuordnung so nicht möglich ist, wird im Verlauf der Arbeit gezeigt.*

## 2 Problemstellung

Zu den Halbstufenpotentialen der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren und zu den Kinetiken der Rekombinationsreaktionen des  $P700^+$  mit den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren liegen zahlreiche Arbeiten vor. Diese weichen zum Teil stark in den Ergebnissen voneinander ab. Zusätzlich ist zu hinterfragen, inwieweit die Ergebnisse durch die Meßmethode verfälscht sind. In der vorliegenden Arbeit erfolgen die Untersuchungen an einem einzigen Organismus, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren. Durch unterschiedliche Ansätze und Meßmethoden wird eine große Sicherheit in der Auswertung erreicht. Ursachen für methodenbedingte Unterschiede werden analysiert und diskutiert. Die in dieser Arbeit zu beantwortenden Fragen sind:

- Bestimmung der Halbwertszeiten der Rekombinationskinetiken für PS I-Komplexe die sich vor der Blitzlichtanregung im Grundzustand befinden oder deren terminalen Eisen-Schwefel-Zentren einfach oder doppelt reduziert sind.
- Bestimmung der Halbstufenpotentiale für die einfache und doppelte Reduktion der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren.
- Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Rekombination des einfach ladungsgetrennten Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$ .
- Zuordnung der Eisen-Schwefel-Zentren in das Energieschema des Photosystems I und eine Abschätzung, auf welchem Wege die Rekombination des ladungsgetrennten Zustandes  $P700^+ F_A^-$  erfolgt.

Darüber hinaus wird das Halbstufenpotential von punktmutierten Photosystemen aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *Rhodobacter sphaeroides* untersucht, um Erfahrungen mit Ligandeneffekten auf den primären Donator zu sammeln.

Abschließend ist es von Interesse, die Funktionalität von kristallisiertem Photosystem I und II zu überprüfen, um sicherzustellen, daß die in dieser Arbeit verwendeten Strukturdaten von Zentren stammen, die dem natürlichen System entsprechen.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 PS I-Komplexe aus *Synechococcus elongatus naegli*

Die trimeren PS I-Komplexe mit einer Zentrenzahl um 100 Chl/P700 werden aus dem thermophilen Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* nach der Vorschrift von Fromme et al. [45] gewonnen. Diese Proben wurden mir freundlicherweise vom Arbeitskreis Fromme/Witt zur Verfügung gestellt. Um die Güte der Probe zu charakterisieren, wurde neben der Zentrenzahl auch der Anteil der Rekombinationsphase mit 250  $\mu$ s bis 2 ms bestimmt. Dieser gibt Aufschluß über das Vorhandensein und die Aktivität der PsaC-Untereinheit, da es ohne Vorreduktion nur zu diesen schnellen Kinetiken kommt, wenn Kofaktoren fehlen. Der unter Zugabe von 0.25  $\mu$ M PMS und 10  $\mu$ M MV bestimmte Anteil beträgt lediglich 3 - 5 %.

#### 3.2 Zeitaufgelöste Absorptionsdifferenzspektroskopie

Photochemische Reaktionen werden häufig mit der Blitzlicht-Spektroskopie untersucht [46, 47, 48]. Durch einen kurzen, intensiven Lichtblitz wird die Photoreaktion ausgelöst. Die Analyse des zu beobachtenden Kofaktors erfolgt über die Absorptionsänderung, die aus dem veränderten Oxidationszustand oder der Spinumkehr nach der Photoreaktion resultiert. Die Absorptionsänderung wird als Funktion der Zeit gemessen, wobei die Blitzanregung dem Zeitnullpunkt entspricht (Abb. 3.1). Die Änderung der Absorption mit der Zeit gibt Auskunft über die Kinetik der Reaktion. Dazu ist es

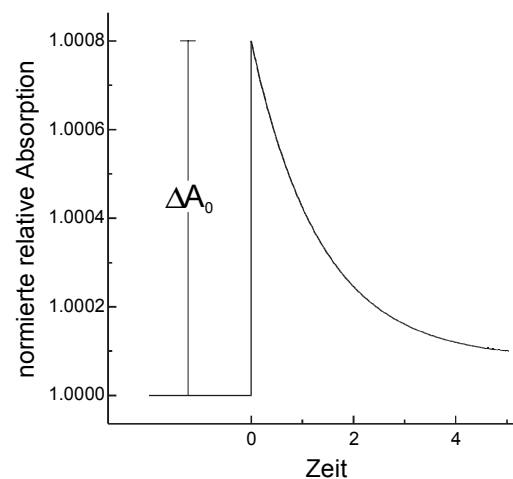


Abb. 3.1: typischer Zeitverlauf der blitzlichtinduzierten Absorptionsänderung

notwendig, die Anregungsdauer wenigstens um den Faktor 5 geringer als die schnellste beobachtete Halbwertszeit zu wählen. War die Blitzlichtanregung sättigend, entspricht die Anfangsamplitude der Differenz zwischen der Absorption der Ausgangskomponente und der des Produktes bei der entsprechenden Wellenlänge. Die wellenlängenabhängige Absorptionsänderung ergibt ein für die zu untersuchende Komponente spezifisches Differenzspektrum. Kommt es bei mehreren Komponenten im untersuchten Wellenlängenbereich zu einer Änderung der Absorption, lassen sich diese durch das Anpassen mehrerer exponentieller Funktionen mit typischen Reaktionshalbwertszeiten separieren, wenn sie nicht direkte

Reaktionspartner sind und damit dieselbe Halbwertszeit besitzen. Abb. 3.2 zeigt das blitzinduzierte Differenzspektrum vom  $P700^+$ /P700.

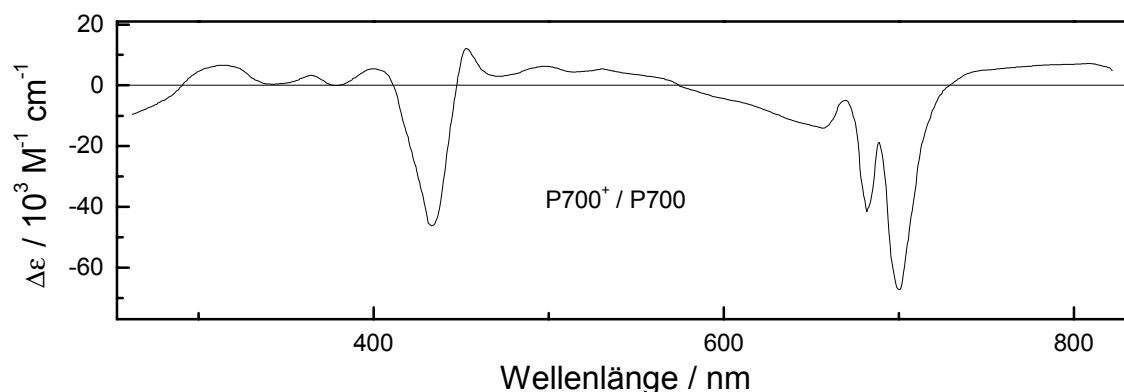


Abb. 3.2: Blitzinduziertes Differenzspektrum vom  $P700^+$ /P700 (B. Ke [33]).

Die Absorptionsdifferenz zum Zeitpunkt  $t$  lässt sich für die Reaktion  $X \rightarrow Y$  durch folgende Formel beschreiben:

$$\Delta A(t)_\lambda = \Delta \epsilon_{\lambda, XY} \cdot \Delta c_Y(t) \cdot d \quad \text{Gl. 3.1}$$

$\Delta \epsilon_\lambda$  ist die Differenz der dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten von X und Y bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\Delta c_Y (= -\Delta c_X)$  die Änderung der Konzentration von Y mit der Zeit  $t$  und  $d$  die Weglänge des Meßlichtes durch die Probe. Da  $\Delta \epsilon$  und  $d$  im Verlauf einer Messung konstant bleiben, ist  $\Delta A(t)_\lambda$  im Idealfall direkt proportional zu  $\Delta c_Y(t)$ . Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz  $I = I_0 \cdot 10^{-A}$  folgt für kleine Absorptionsänderungen ( $\Delta A \ll 1$ ):

$$\frac{\Delta I(t)}{I} = -\Delta A(t) \cdot \ln 10 \quad \text{Gl. 3.2}$$

$I$  ist hierbei die Meßlichtleistung hinter der Probe vor der Anregung. Der Verlauf der Konzentrationsänderung  $\Delta c_Y(t)$  lässt sich so über den Zeitverlauf der Lichtleistungsänderung  $\Delta I(t)$ , bzw. der von einem geeigneten Detektor ausgegebenen Spannungsänderung  $\Delta U(t)$  verfolgen. Absorptionsänderungen bei 826 nm im Zeitbereich von Mikro- und Millisekunden werden in einem aus Einzelkomponenten aufgebauten Spektrometer gemessen (Abb. 3.3). Als Meßlichtquelle dient eine 250 W Wolfram - Halogenlampe (OSRAM). Ihr Licht wird durch Farbfilter (RG780, 6mm von Schott) und einen 5 cm-Wasserfilter zur Absorption der Wärmestrahlung auf eine Küvette mit 10 mm optischer Weglänge gebündelt. Das aus der Küvette austretende Licht wird nach ca. 1 m erneut durch eine Sammellinse auf eine Silizium Photodiode (SGD 444 von EG&G oder OSD-100-5T von Centronic) fokussiert. Der große Abstand des Detektors zur Probe soll das Einfallen von isotropem Fluoreszenzlicht reduzieren. Zusätzlich

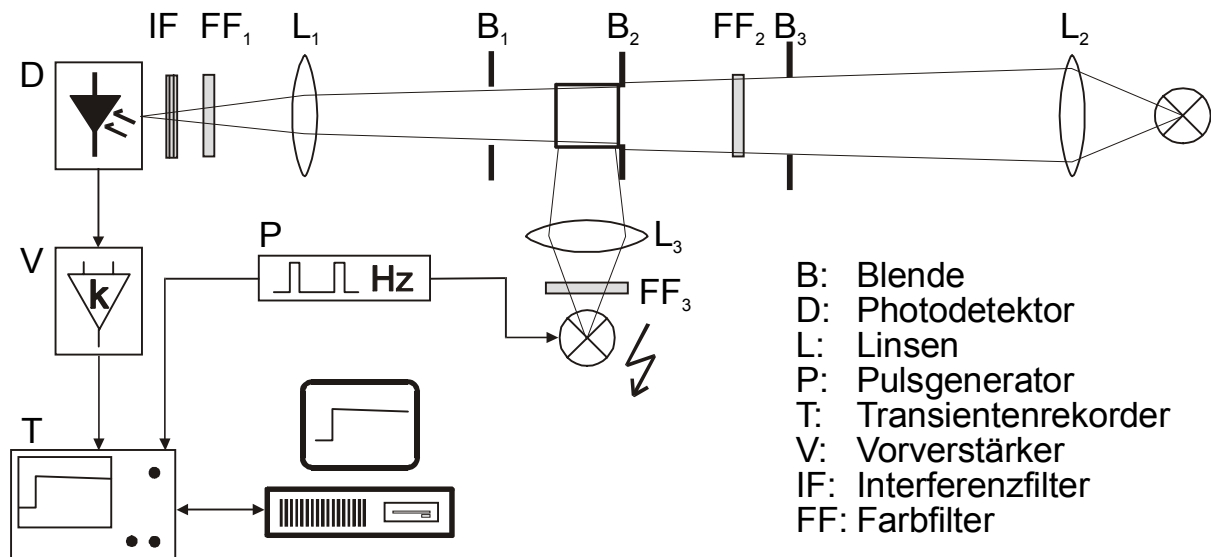


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Apparatur für die transiente Blitzlichtspektroskopie im Mikrosekunden- bis Sekundenbereich

befindet sich vor der Photodiode eine Kombination von einem Kantenfilter mit einem Interferenzfilter (RG780, MA7-05 826.2 beide von Schott), die einfallende Fluoreszenz, gestreutes Anregungslicht und Fremdlicht herausfiltern soll. Der von der Meßlichtleistung abhängige Strom der Photodiode fließt über einen Widerstand von  $1\text{ k}\Omega$ . Die dabei abfallende Spannung wird nach Verstärkung (TEK AM 502 von Tektronix oder SR560 von Stanford Research Systems) mit einem Transientenrekorder von Tektronix, der mit dem Anregungsblitz synchron getriggert ist, aufgezeichnet. Die Probe wird mit dem Licht einer Xenonblitzlampe angeregt. Vor der Blitzlampe befindet sich ein Bandfilter, der im blauen durchlässig ist (CS96-4 from Corning). Die Dauer der Lichtblitze beträgt ca.  $15\text{ }\mu\text{s}$ . Die verwendete elektrische Bandbreite variierte je nach Zeitskala zwischen DC-10kHz, DC-100kHz oder DC-1MHz und wird am Vorverstärker eingestellt.

Absorptionsdifferenzspektren wurden mit einer leicht abgewandelten Apparatur gemessen. Die Lichtquelle war hier eine 55 W Halogenlampe, deren Licht mit einem Monochromator mit  $3\text{ nm}$  optischer Bandbreite gefiltert wurde. Detektiert wurde das Meßlicht mit einem Photomultiplier (EMI 9558BQ). Um Fremdlicht zu minimieren, wurde vor dem Photomultiplier eine zur eingestellten Wellenlänge passende Kombination aus Farb- und Interferenzfilter platziert. Das Spannungssignal wurde direkt mit einem Transientenrekorder (TDS 320, Tektronix) aufgezeichnet und in einen PC transferiert. Dort wurde an die Transienten, je nach Verlauf, eine mono- oder biexponentielle Funktion mit oder ohne konstantem Anteil angepaßt. Das Kriterium für die beste Anpassung war die Minimierung der ungewichteten Fehlerquadratsumme.

### 3.3 EPR-Messungen

Die theoretischen Grundlagen der EPR-Spektroskopie sind in zahlreichen Lehrbüchern und Monographien [49 - 54] ausführlich beschrieben. Im folgenden wird auf die Meßprinzipien, die der EPR-Spektroskopie zugrunde liegen, eingegangen.

Das Meßprinzip der EPR-Spektroskopie beruht auf der Ausrichtung von ungepaarten Elektronenspins in einem statischen Magnetfeld  $\mathbf{B}_0$ . Die Energie eines magnetischen Momentes in einem statischen Magnetfeld  $\mathbf{B}_0$  ergibt sich in der klassischen Elektrodynamik zu

$$E = -\boldsymbol{\mu}_e \mathbf{B}_0. \quad \text{Gl. 3.3}$$

Mit einem ungepaarten Elektronenspin  $S$  ist ein magnetisches Moment verbunden

$$\boldsymbol{\mu}_e = -g\beta_e \mathbf{S}, \quad \text{Gl. 3.4}$$

wobei  $\beta_e$  das Bohrsche Magneton und  $\hat{\mathbf{S}}$  der Operator des Elektronenspins ist. Der sogenannte  $g$ -Wert gibt die Proportionalitätskonstante zwischen  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_e$  und  $\beta_e \hat{\mathbf{S}}$  an. Für ein freies Elektron ist  $g = g_e = 2.0023$ . Analog zu Gl. 3.3 wird für die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung des Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld der Hamilton-Operator

$$\mathcal{H} = -\hat{\boldsymbol{\mu}}_e \mathbf{B}_0 = g\beta_e \hat{\mathbf{S}} \mathbf{B}_0 \quad \text{Gl. 3.5}$$

formuliert. Für einen freien ungepaarten Elektronenspin mit Spinquantenzahl  $S = 1/2$  gibt es zwei mögliche Orientierungen in einem statischen Magnetfeld, die durch die magnetischen Quantenzahlen  $m_s = +1/2$  ("parallele" Ausrichtung) und  $m_s = -1/2$  ("antiparallele" Ausrichtung) charakterisiert werden. Die energetische Aufspaltung  $\Delta E = E_+ - E_-$ , die auch als Elektron-Zeeman-Aufspaltung bezeichnet wird, beträgt für diese beiden Niveaus

$$\Delta E = g\beta_e B_0. \quad \text{Gl. 3.6}$$

In einem EPR-Experiment werden durch Einstrahlen von elektromagnetischen Wellen Übergänge zwischen den beiden Spinniveaus induziert, wenn die Resonanzbedingung

$$h\nu = \Delta E = g\beta_e B_0 \quad \text{Gl. 3.7}$$

erfüllt ist (siehe Abb. 3.4). Bei einem statischen Magnetfeld von 350 mT und  $g = g_e$  liegt die Resonanzfrequenz bei  $\nu = 9.5$  GHz und damit im X-Band (Wellenlänge  $\lambda \approx 3$  cm) des Mikrowellenbereiches.

Die experimentellen Beobachtungen werden in der EPR-Spektroskopie häufig in dem Formalismus des Spin-Hamilton-Operators wiedergegeben. Der Spin-Hamilton-Operator faßt alle

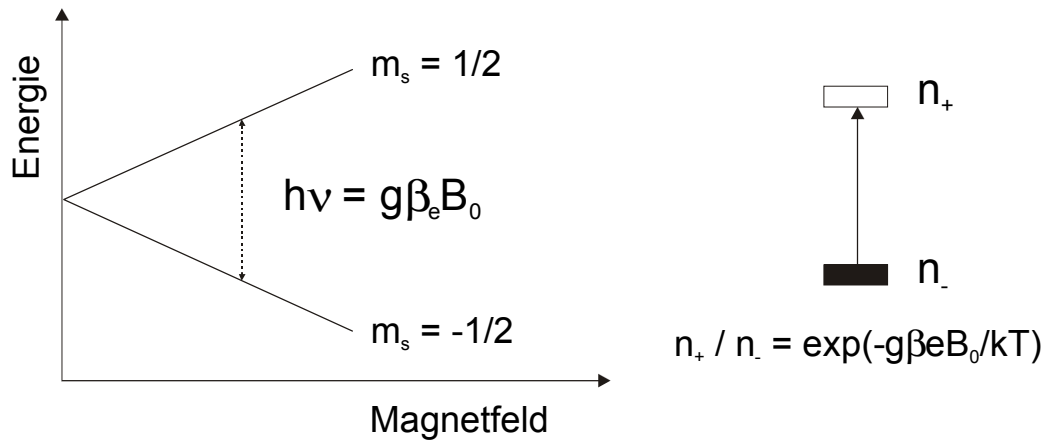


Abb. 3.4: Elektron-Zeeman-Aufspaltung eines ungepaarten Elektronenspins  $S=1/2$  in einem statischen Magnetfeld  $B_0$ . Nach der Boltzmann-Verteilung besteht zwischen den beiden Energieniveaus  $m_s = \pm 1/2$  ein Besetzungsunterschied ( $\Delta n = n_- - n_+$ ), so daß bei der Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung der Frequenz  $\nu = g\beta_e B_0/h$  eine Absorption erfolgt. Voraussetzung dafür ist, daß durch Relaxationsprozesse der Besetzungsunterschied auch während der Einstrahlung der elektromagnetischen Strahlung aufrecht erhalten werden kann.

molekularen Wechselwirkungen zusammen, die zu dem magnetischen Resonanzspektrum beitragen und wird so formuliert, daß er nur auf den Spinanteil der elektronischen Grundzustandswellenfunktion wirkt.

Bei der EPR-spektroskopischen Charakterisierung von Übergangsmetallkomplexen findet man deutliche Abweichungen von dem  $g_e$ -Wert des freien Elektrons [52]. Zusätzlich beobachtet man, daß die Elektron-Zeeman-Aufspaltung von der Orientierung des molekularen Achsensystems im magnetischen Feld abhängt. Dies ist darin begründet, daß auch das Bahnmoment  $\mathbf{L}$  eines Elektrons ein magnetisches Moment besitzt ( $\mu_L = \beta_e \mathbf{L}$ ), dessen Beitrag zur effektiven Elektron-Zeeman-Aufspaltung in den Übergangsmetallkomplexen von der Spin-Bahn-Kopplung ( $\lambda \mathbf{LS}$ ) und der energetischen Aufspaltung der d-Orbitale abhängt [51, 52]. Im Spin-Hamilton-Operator lautet der Term für die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung

$$\mathcal{H}_{EZ} = \beta_e \mathbf{B}_0 g \hat{\mathbf{S}} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Dabei ist  $\hat{\mathbf{S}}$  der Operator des effektiven Spins. Die Einflüsse von Spin- und Bahnmoment auf die EPR-Spektren werden in der (3x3) Matrix  $g$  zusammengefaßt, welche traditionell als  $g$ -Tensor bezeichnet wird [49, 51]. Der  $g$ -Tensor ist kennzeichnend für die Symmetrie und die elektronische Struktur einer paramagnetischen Spezies.

Hyperfeinwechselwirkung zwischen Elektron- und Kernspin ist ein weiterer wichtiger Term im Hamiltonoperator. Da er jedoch bei EPR-Spektren von  $F_A^-$  und  $F_B^-$  nicht beobachtet wird, findet keine weitergehende Beschreibung statt.

In einer Lösung liegt eine statistische Verteilung an Molekülerorientierungen relativ zum äußeren Magnetfeld vor. Bei einer richtungsabhängigen Wechselwirkung, z.B. bei anisotropem g-Tensor, hängt die EPR-Linienposition von der Orientierung des paramagnetischen Moleküls im Magnetfeld ab. Während in einer flüssigen Lösung aufgrund der Rotation der paramagnetischen Moleküle, die im allgemeinen schneller als die Zeitskala des EPR-Experimentes ist, alle richtungsabhängigen Wechselwirkungen herausgemittelt werden, sieht man in einer gefrorenen Lösung eine Überlagerung der verschiedenen Resonanzpositionen. Diese sogenannten Pulverspektren spiegeln die Verteilung der Molekülerorientierungen wieder. In den hier untersuchten Eisen-Schwefel-Zentren dominiert die g-Anisotropie das EPR-Spektrum, ohne daß zusätzliche Hyperfeinaufspaltungen zu komplexen Linienmustern führen, da die Aufspaltung in der EPR geringer ist, als die Linienbreite. Abb. 3.5 zeigt, wie aus einem derartigen Pulverspektrum die Hauptwerte des g-Tensors direkt abgelesen werden können. Die Lage des g-Tensors in einem paramagnetischen Molekül, d.h. die Richtungen der g-Tensorhauptachsen, kann jedoch nur anhand von EPR-Messungen an Einkristallen bestimmt werden.

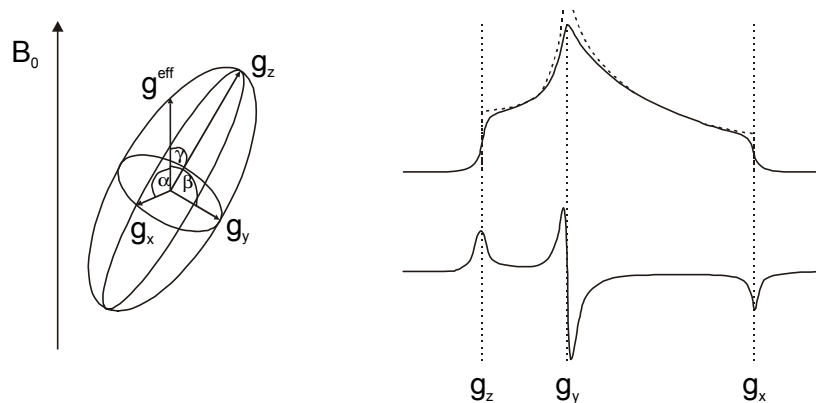


Abb. 3.5: Der g-Tensor (hier dargestellt durch ein Ellipsoid) kann beliebige Orientierungen relativ zum äußeren Magnetfeld einnehmen. Der effektive g-Wert für eine beliebige Orientierung ergibt sich dabei aus den Hauptwerten des g-Tensors und den Winkeln  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , welche die Lage des g-Tensors relativ zum Magnetfeld beschreiben:  $g = (g_x^2 \cos^2 \alpha + g_y^2 \cos^2 \beta + g_z^2 \cos^2 \gamma)^{1/2}$ . In einer gefrorenen Lösung liegt eine statistische Verteilung der molekularen Orientierungen vor. Daraus resultiert ein Pulverspektrum, das exemplarisch als Absorptionsspektrum und seiner ersten Ableitung gezeigt wird. EPR-Spektren werden aufgrund ihrer Aufnahmetechnik (phasensensitive Detektion mit Feldmodulation) meist in der ersten Ableitung dargestellt.



Für die Beschreibung der Spin-Spinkopplungen im einfach reduzierten Eisen-Schwefel-Zentrum  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$  geht man davon aus, daß jeweils zwei Eisen-Atomen ein Dimer bilden [55]. Während das eine Dimer den gemischtvalenten Zustand  $\text{Fe}_1^{2.5+} - \text{Fe}_2^{2.5+}$  beibehält ist das andere zum  $\text{Fe}_3^{2+} - \text{Fe}_4^{2+}$  reduziert. Mit  $S = 5/2$  für  $\text{Fe}^{3+}$  (high spin) und  $S = 2$  für  $\text{Fe}^{2+}$  (high spin) ergibt sich damit für das erste Dimer bei ferromagnetischer Kopplung ein Spin von  $S_{12} = 9/2$  und für das zweite ein Spin von  $S_{34} = 4$ . Diese beiden Dimerspinn koppeln nun antiferromagnetisch zum Gesamtspin von  $S_{\text{gesamt}} = 1/2$ , der dann mit der EPR detektiert werden kann. Mit Hilfe dieses Modells und den bekannten g-Tensoren von  $\text{Fe}^{3+}$  (high spin) und  $\text{Fe}^{2+}$  (high spin) läßt sich auch erklären, daß die einzelnen g-Komponenten des g-Tensors unterschiedliche Werte haben.  $g_z$  sollte bei 2.0 liegen,  $g_x$  und  $g_y$  unter 2.0 [55]. Dies wird für  $F_A^-$  und  $F_B^-$  auch beobachtet.

Die EPR Spektren wurden mit einem Bruker Spektrometer ESP300 aufgezeichnet. Die Temperatur der Probe wird in einem Helium-Fingerkryostaten (ESR9 von Oxford) eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurde mit folgenden Einstellungen gemessen: Mikrowellenfrequenz: 9.43 GHz; Leistung: 20 mW; Modulationsfrequenz: 100 kHz; Amplitude: 10 G; Zeitkonstante 128 ms; Temperatur: 10 K.

Da für ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis eine hohe Konzentration der paramagnetischen Zentren ( $> 10 \mu\text{M}$ ) benötigt wird, erfolgte die Einstellung der Redoxpotentiale in leicht abgeänderter Form zu der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode. Es wurden 80  $\mu\text{l}$  der hochkonzentrierten Probelösung in einen EPR-Röhrchen mit 4 mm Außendurchmesser vorgelegt. Dazu wurde eine Hamiltonspritze mit einer 220 mm langen Edelstahlkanüle verwendet. Durch Vermessen mit einer Mikrometerschraube wurden EPR-Röhrchen mit möglichst gleichem Durchmesser im Probenbereich selektiert. Die vorgelegte Probe wurde mit 10  $\mu\text{l}$  einer vorgefertigten 2 M Pufferlösung versetzt und mit nachgereinigtem Argon gespült. Nach dem Spülen der Probe wurde unter fortgesetztem Argonstrom 10  $\mu\text{l}$  einer frischen 300 mM Dithionit-Lösung hinzugegeben. Das EPR-Röhrchen wurde anschließend verschlossen und 30 Minuten im Eisbad durch Schütteln durchmischt. Anschließend wurde die Probe in durch flüssigen Stickstoff abgekühlten Alkohol schnell eingefroren. Da der Wärmekontakt wesentlich höher, was zu einem schnelleren Einfrieren der Probe führt. Darüber hinaus wird die Probe gleichmäßig eingefroren, was ein Zerspringen des Quarzröhrchens verhindert. Zuletzt wurden die Proben bis zur Messung in flüssigem

Stickstoff gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden bei bestmöglicher Dunkelheit, nur unter Zuhilfenahme einer IR-Quelle und einem Nachtsichtgerät, durchgeführt.

Bei dem Verdünnen der Puffer von 2 M auf 200 mM muß beachtet werden, daß sich der eingestellte pH-Wert ändert. Diese Änderung wurde in Vorversuchen bestimmt. Zusätzlich wurde der pH-Wert in den EPR-Proben nach der Messung bestimmt. Dieser Wert ist jedoch durch zwangsläufig beim Auftauen, Überführen und Verdünnen der Probe oxidiertes Dithionit verfälscht. Tabelle 3.1 soll einen Anhaltspunkt über die Verschiebung des pH-Wertes geben.

Puffersubstanz	Succinat	MES	HEPES	Tricine	Caps
pH (2M)	5.62	6.35	7.30	8.40	9.92
pH nach Verdünnung auf 200 mM	4.90	5.58	6.58	7.50	9.04
$\Delta$ pH	-0.72	-0.77	-0.72	-0.90	-0.88

*Tabelle 3.1: Verschiebung des pH-Wertes beim Verdünnen einer 2 M Puffer-Lösung auf 200 mM puffernde Substanz*

Zur Kontrolle, in wie weit die Meßbedingungen bei der Aufzeichnung der EPR-Signale die Probe zerstört haben, wurden stichprobenartig Nachuntersuchungen angestellt. Die Proben wurden hierzu über eine PD10-Säule von Dithionit befreit und anschließend charakterisiert. Unter anderem wurde das Absorptionsspektrum zwischen 400 nm und 800 nm aufgezeichnet und mit dem ursprünglichem Spektrum verglichen. Außerdem wurde der Anteil einer auf die Abtrennung der PsaC-Untereinheit hindeutenden 2 ms Kinetik gemessen und überprüft, ob die schnelle und langsame Kinetik sich wie gewohnt bei vorgegebenem pH mit Dithionit einstellen läßt. Alle Tests haben gezeigt, daß die Probe nicht im nachweisbaren Rahmen geschädigt wurde.

### 3.4 Elektrochemische Methoden

Für eine Redoxreaktion  $\text{Ox} + z\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Red}$ , läßt sich das Bestreben Elektronen aufzunehmen oder abzugeben durch die Nernstsche Gleichung beschreiben:

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Red}]}{[\text{Ox}]} \quad \text{Gl. 3.9}$$

$E$  = Potential gegen eine Normal-Wasserstoff-Elektrode ( $\frac{1}{2} \text{H}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{e}^-$ ; 1 atm  $\text{H}_2$ , pH = 0) in Volt

$E^0$  = Standard Halbstufenpotential bei pH = 0 in Volt

$T$  = Temperatur in Kelvin

$R$  = Gaskonstante ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$z$  = Zahl der Elementarladungen

$F$  = Faradaykonstante ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ )

Durch Einsetzen der Konstanten und der Temperatur mit 298 K erhält man für eine Einelektronenreaktion die vereinfachte Gleichung:

$$E = E^0 - 0.059 \cdot \log \frac{[\text{Red}]}{[\text{Ox}]} \quad \text{Gl. 3.10}$$

Ist die Redoxreaktion mit einer Protonierung bzw. Deprotonierung gekoppelt,

$\text{Ox} + z\text{e}^- + y\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_y \text{Red}$ , dann gilt:

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{H}_y \text{Red}]}{[\text{Ox}][\text{H}^+]^y} = E^0 - 2,3 \cdot \frac{yRT}{zF} \text{pH} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{H}_y \text{Red}]}{[\text{Ox}]} \quad \text{Gl. 3.11}$$

Hieraus resultiert für  $E_{\text{m,pH}}$ :

$$E_{\text{m,pH}} = E^0 - 2,3 \cdot \frac{yRT}{zF} \text{pH} \quad \text{Gl. 3.12}$$

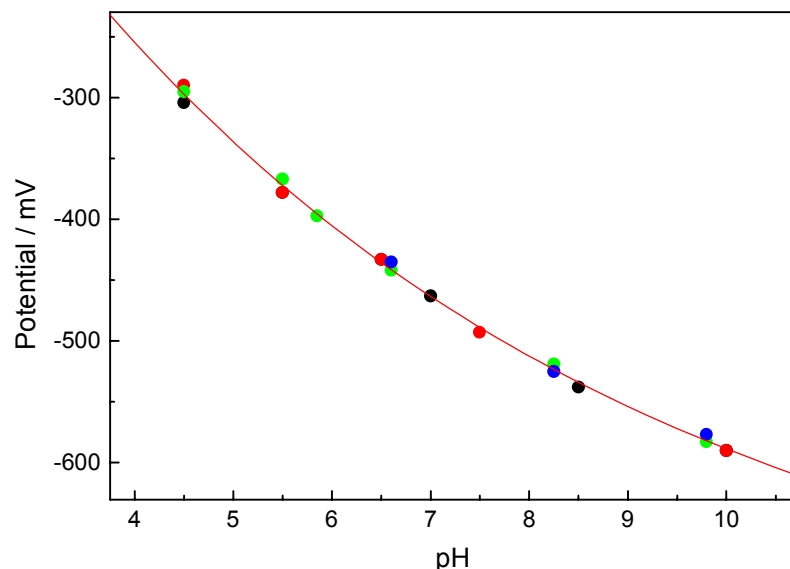
Neben der Abhängigkeit des Halbstufenpotentials vom pH haben weitere Faktoren, wie zum Beispiel Ionenstärke, Ligandeneffekte, elektrische Potentialdifferenzen und Lösungsmittelfeffekte einen Einfluß auf das Halbstufenpotential. Eine gute Übersicht zur Elektrochemie in biologischen Systemen geben Referenzen [56] und [57, Kapitel 2].

Die Bestimmung der Halbstufenpotentiale gliedert sich in zwei grundsätzliche Aufgaben. Zum einen in die Einstellung des Redoxpotentials in der Probe, zum anderen in die Bestimmung des Anteils der reduzierten oder oxidierten Form des Redoxpaares bei vorgegebenem Potential. Der Anteil wird dann gegen das Redoxpotential aufgetragen und das Halbstufenpotential durch die Anpassung mit einer entsprechend modifizierten Nernstschen Gleichung

bestimmt. Während die Meßmethoden zur Bestimmung des Anteils der reduzierten bzw. oxidierten Komponente sowie die spezielle Modifizierung der Nernstfunktion in eigenen Kapiteln behandelt wird, folgt hier die Beschreibung der Einstellung von Potentialen im Bereich zwischen -300 mV bis -600 mV.

Die Redoxpotentiale werden unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe einer Dithionitlösung bei vorgegebenem pH eingestellt. Die Potentiale sind reproduzierbar und wenigstens 30 Minuten stabil. Die Lösungen beinhalten 50 mM des entsprechenden pH-Puffers, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0.02 %  $\beta$ -DM. Die zweiwertigen Ionen werden der Meßlösung zugesetzt, da sich bei Vorversuchen gezeigt hat, daß dies bei hohen pH-Werten zu einer Verringerung der schnellen Kinetik, die auf eine Denaturierung des Systems hinweist, führt. Vermutlich dienen die zweiwertigen Ionen als Gegenionen für die deprotonierten Aminosäuren, was die Probe stabilisiert. Als pH-Puffer wurden in den angegebenen Bereichen folgende Substanzen verwendet: pH 4.0-5.5 Bernsteinsäure, pH 6.0-6.5 Mes, pH 7.0 Pipes, pH 7.5 Hepes, pH 8.0-8.5 Tricine, pH 9.0-10.0 Glycine, pH 10.5 Caps. Die Puffer wurden mit NaOH und HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und regelmäßig kontrolliert. Die Aktivität von PSI wird in dem verwendeten pH-Bereich in der Literatur [58] als annähernd konstant beschrieben.

Die exakte Abhängigkeit des Redoxpotentials vom gegebenen pH wurde mehrfach unter strikt anaeroben Bedingungen mit Methylviologen kontrolliert (Abb. 3.6). Hierzu wurde der Puffer



*Abb. 3.6: Abhängigkeit des mit Dithionit eingestellten Redoxpotentials vom pH. Die Meßpunkte geben das Potential an, das bei gegebenem pH-Wert gemessen wird, wenn die anaerobe Meßlösung mit 20  $\mu\text{M}$  Methylviologen und 2 mM Dithionit versetzt wird. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen 3 Meßserien mit einem zeitlichen Abstand von wenigstens 3 Monaten. Die rote Linie ist eine Extrapolation zwischen den Meßpunkten.*

vorgelegt, der Sauerstoff mit nachgereinigtem Argon herausgespült, 2 mM Dithionit und 20  $\mu$ M MV hinzugefügt, das Redoxpotential gemessen und anschließend der pH-Wert kontrolliert. Die so gefundene Abhängigkeit stimmt weitestgehend mit der überein, die in der Literatur für Messungen in reinem Wasser angegeben wird [59].

Eine Redox titration unter Vorgabe des pH wurde bereits in der Vergangenheit zur Bestimmung des Halbstufenpotentials von Ferredoxin verwendet [96]. Hierbei wurde jedoch nicht Dithionit sondern  $H_2$  als Reduktionsmittel verwendet, was für Messungen an PS I nicht möglich ist, da dies nicht mit  $H_2$  reagiert.

Die Redoxpotentiale wurden mit einer Einstabmeßkette (Pt - Ag/AgCl, Schott PT5900A mit Knick Präzisions pH-Meter)

oder einem Paar von Elektroden (Pt - Calomel, Radiometer P1040, K4040 mit Radiometer PHM82 Standard pH-Meter) gemessen. Das Elektrodenpaar wurde meist in der Spezialküvette nach Abb. 3.7 verwendet. Die Elektroden wurden regelmäßig mit Chinhydron über den gesamten Bereich kalibriert. Alle angegebenen Redoxpotentiale verstehen sich in Bezug auf die Normalwasserstoffelektrode (NHE). Wenn das Redoxpotential direkt gemessen wurde, wurde die Meßlösung mit 100 mM KCl versetzt, um die Diffusionsspannung am Diaphragma der Referenzelektrode zu reduzieren.

Zur Kontrolle dieser Methode wurde MV unter Kontrolle des Absorptionsspektrums von 400 nm bis 800 nm titriert (Abb. 3.8). Das *Schema 3.1* zeigt die Oxidationsübergänge des Methylviologen. Methylviologen kann mit dieser Methode titriert werden, da sein Halbstufenpotential unabhängig vom pH-Wert ist (Abb. 3.8). Zur Bestimmung der

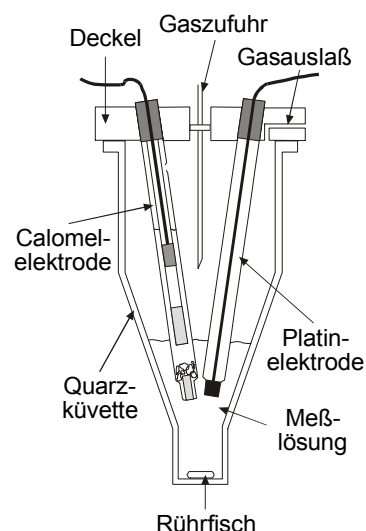
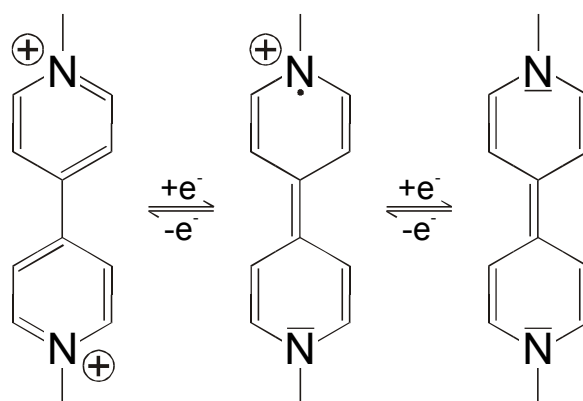


Abb. 3.7: Querschnitt durch die hermetisch verschließbare Küvette für Redoxmessungen unter anaeroben Bedingungen



Schema 3.1: Grenzstrukturen der Oxidationsstufen von Methylviologen [60]

Halbstufenpotentials wurde die Fläche unter der Absorptionskurve von 453 nm - 800 nm gegen das Redoxpotential aufgetragen. Durch Anpassen der Nernstfunktion für eine Einelektronenreaktion erhält man ein Halbstufenpotential von  $-(436 \pm 3)$  mV (Abb. 3.9). Bei der Auswertung sind die Messungen bei Redoxpotentialen unterhalb von -500 mV nicht berücksichtigt worden, da durch den Übergang in die doppelt reduzierte Form die Absorption wieder abnimmt. Das so bestimmte Halbstufenpotential stimmt annähernd mit dem in der Literatur gefundenen Wert von  $-(446 \pm 2)$  mV [61] überein.

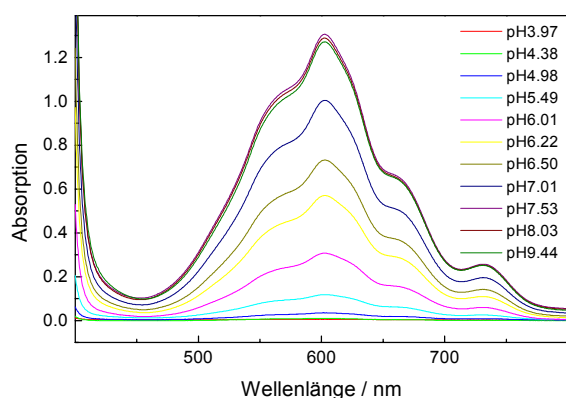


Abb. 3.8: Extinktionsspektren von Methylviologen mit einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  und einer optischen Weglänge von  $10 \text{ mm}$  in Abhängigkeit des Redoxpotentials, eingestellt über den pH

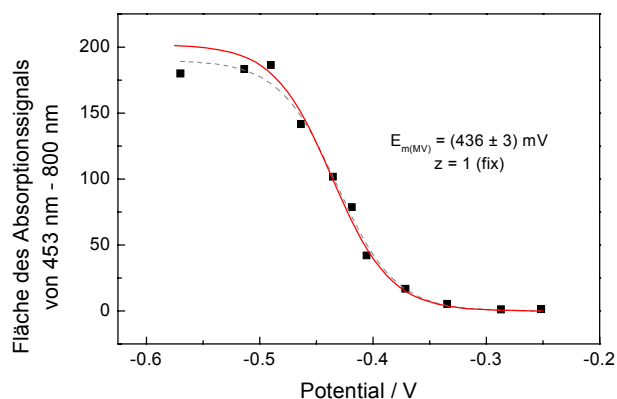


Abb. 3.9: Auftragung der Fläche unter dem Absorptionsspektrum aus Abb. 3.8 von 453 nm bis 800 nm über das Redoxpotential, die Kurvenzüge resultieren aus einer Anpassung der Nernstfunktion an die Meßwerte, die rote Kurve vernachlässigt, die in der gestrichelten Kurve berücksichtigten Meßpunkte bei sehr negativem Potential, die aufgrund der Doppelreduktion des MV zu gering sind

### 3.5 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration

Überwiegend wurde in dieser Arbeit die diffusionskontrollierte amperometrische Bestimmung des Sauerstoffgehaltes angewendet. An der membranbedeckten Arbeitselektrode wird der Sauerstoff nach der Reaktionsgleichung  $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$  reduziert. Dazu wird in unserem Fall eine Spannung von -680 mV an der Platinelektrode angelegt. Nach dem 1. Fick'schen Gesetz (Gl. 3.13) diffundiert der Sauerstoff von außen über die Membran zur Arbeitselektrode.

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad \text{Gl. 3.13}$$

$J$  = Stoffmengenstrom ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$D$  = Diffusionskoeffizient ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )

$\frac{dc}{dx}$  = Konzentrationsgradient vor der Meßelektrode ( $\text{mol m}^{-4}$ )

Unter der Annahme, daß die Konzentration  $c$  in der Meßlösung vor der Membran durch die Schicht der Dicke  $\delta$  linear bis auf  $c = 0$  an der Oberfläche der Elektrode abfällt, kann man für  $dc/dx = c/\delta$  schreiben. Nach dem Faraday Gesetz ergibt sich dann der meßbare elektrische Strom zu:

$$I = \frac{z \cdot F \cdot A \cdot D}{\delta} \cdot c \quad \text{Gl. 3.14}$$

$z$  = Zahl der Elementarladungen (hier 4)

$F$  = Faradaykonstante ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ )

$A$  = von Elektrolyt benetzte Elektrodenoberfläche ( $\text{m}^2$ )

$\delta$  = Schichtdicke der Membran (m)

Geht man davon aus, daß in dem relevanten Meßbereich das Fick'sche Gesetz streng anzuwenden ist, hängt die gemessene Stromstärke  $I$  linear von der Konzentration  $c(\text{O}_2)$  in der Meßlösung ab.

Bei den Messungen wurden die Sauerstoffkonzentrationen mit einer Clark-Elektrode der Firma Biolytik (Abb. 3.10, MS 1 PO mit Verstärker RE K1-1 von Biolytik) in einer speziellen Sauerstoffmeßzelle (Abb. 3.11, Eigenbau MVI) gemessen. Diese Küvette erlaubt zusätzlich die Messung transienter Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Sauerstoffelektrode wird vor jedem Versuch mit luftgesättigtem Wasser und einer frisch zubereiteten Dithionitlösung kalibriert. Die Sauerstoffkonzentration des luftgesättigten Wassers wird unter Berücksichtigung von Druck und Temperatur berechnet. Der Zeitverlauf der  $\text{O}_2$ -Konzentration wird nach A/D-Wandlung mit einem PC aufgezeichnet.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration ist die Messung der elektromotorischen Kraft über einen Festkörperelektrolyt. Hierfür wird mit Yttrium dotiertes Zirkondioxid verwendet, welches bei Temperaturen über 450 °C zu einem guten Leiter für Sauerstoffionen wird. Der Effekt der Ionenleitfähigkeit beruht auf der Ausbildung von Leerstellen im Kristallgitter des Zirkondioxids. Als Elektroden werden sowohl auf der Referenzseite als auch auf der Meßseite feine Gitter von Platin verwendet. Die Spannung der Zelle hängt entsprechend der Nernstschen Gleichung von den Sauerstoffpartialdrücken ab:

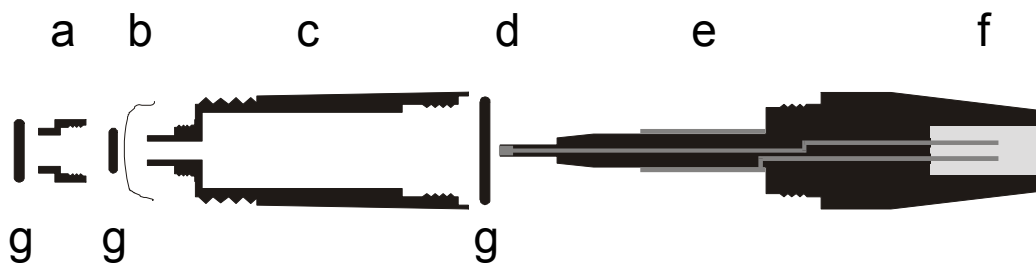


Abb. 3.10: Clark Elektrode, a Fixierkappe, b Teflonfolie, typisch 25  $\mu\text{m}$  stark, c Elektrolytraum (0.1 M KCl), d Platinspitze, e Silber/Silberchloridreferenzelektrode, f Anschlußbuchse für Limosa-Stecker, g Dichtungsringe

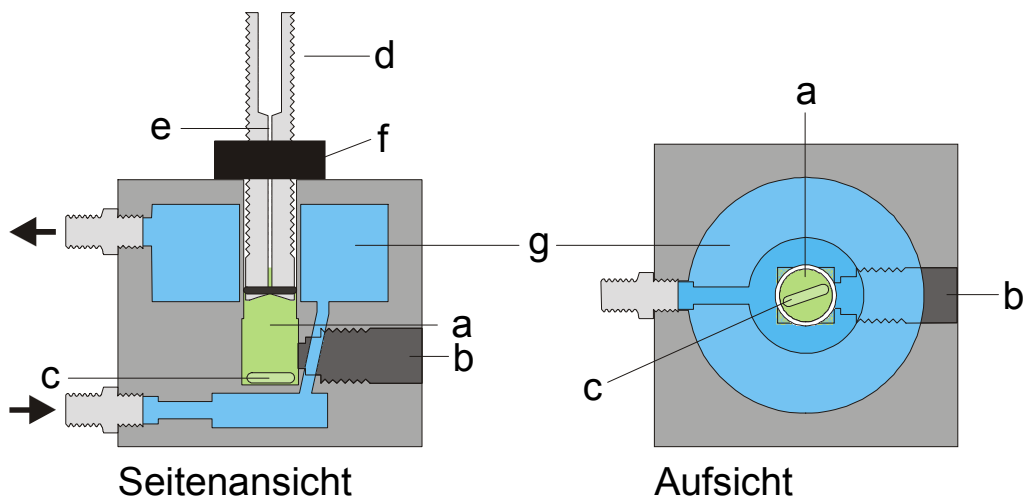


Abb. 3.11: Sauerstoffmeßzelle, Meßlicht durchstrahlt die Meßzelle von hinten nach vorne, Anregungsblitze treffen von links auf den Probenraum; a Probenraum (rechtwinklig), b Sensorzuführung, c Rührfisch, d Stempel zum Befüllen, Reinigen und blasenfreiem Abdecken des Probenraumes, e Kapillare zum Druckausgleich und Einleiten von Inertgas, f Gewinding zum Arretieren der Stempelhöhe, g Temperierungskreislauf



$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{p_{\text{Meß}}}{p_{\text{Ref}}} \quad \text{Gl. 3.15}$$

$z$  = Zahl der Elementarladungen (hier 4)

$F$  = Faradaykonstante ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ )

$T$  = Temperatur in Kelvin

$p_{\text{Meß}}$  = Sauerstoffpartialdruck auf der Meßgasseite in bar

$p_{\text{Ref}}$  = Sauerstoffpartialdruck auf der Referenzseite mit 0.20946 bar

Unter Berücksichtigung der oszillierenden Temperaturänderungen bei beheizten Sensoren läßt sich so die aktuelle Sauerstoffkonzentration aus der gemessenen Spannung über das Zirkondioxid direkt berechnen. Eine Kalibrierung wie bei der Clark-Elektrode entfällt.

Diese Methode wurde zur Bestimmung von Konzentrationsänderungen bei sehr niedriger Sauerstoffkonzentration verwendet. Dazu wird das mit Oxysorb (Messer Griesheim) vom Restsauerstoff befreite Inertgas, nach dem es über die Probe geströmt ist, über eine Zirkondioxidelektrode (Programmelectronic AG, Dornbach, Schweiz) geleitet. Bei diesem Aufbau ist eine quantitative Aussage über den Sauerstoffgehalt in der Lösung nicht möglich, da diese durch den übergeleiteten Argonstrom verfälscht wird. In dieser Arbeit wurde die Methode nur eingesetzt, um anzuzeigen, ob die Probe frei von Sauerstoff war.

### 3.6 Einstellung der Temperatur

Für Messungen im Temperaturbereich von  $6^\circ\text{C}$  -  $40^\circ\text{C}$  wurde die Küvette aus Abb. 3.7 in Verbindung mit einem Peltier-Element verwendet. Die eine Gegenseite des Peltier-Elementes wurde auf einen mit Leitungswasser gekühlten Kupferblock geklebt, der damit die Referenztemperatur vorgab. Je nach Polung und Stärke des angelegten Stromes von 0 bis 4 A konnte so die Temperatur zwischen  $6^\circ\text{C}$  und Leitungswassertemperatur bzw. Leitungswassertemperatur und  $40^\circ\text{C}$  eingestellt werden. Bei Temperaturen unter Raumtemperatur wurde die Küvette mit Argon umspült, um ein Beschlagen der Glasflächen zu verhindern. Ein weiterer Aufbau schließt die gesamte Küvette mit einem durchfließbaren Kupferblock ein, der lediglich zwei Öffnungen für das Meßlicht besitzt. Der Kupferblock sitzt wiederum in einem Isoliermantel der von einem Gehäuse mit Sichtfenstern umgeben ist. Der Kupferblock wird mit Flüssigkeit aus einem Thermostaten durchflossen und der thermisch isolierte Aufbau verhindert ein Beschlagen der optischen Fenster.

Im Temperaturbereich von 180 K bis 298 K wurde ein Stickstoffbad-Kryostat der Firma Oxford Instruments (DN 1710) verwendet, der für Messungen bis 77 K geeignet ist. Der Vakuummantel des Probenraumes ermöglicht eine stabile Temperatureinstellung und verhin-

dert das Beschlagen der Sichtfenster. Der Kryostat wurde mit dem Temperaturregelsystem ITC 4 von Oxford Instruments betrieben. Die Temperatur in der Küvette wurde zusätzlich mit einem Thermoelement überwacht.

### 3.7 Präparation Organischer Gläser

Messungen, bei denen sich die Probe im glasartigen Zustand befindet, erfolgen aus unterschiedlichen Gründen. Die häufigste Anwendung für organische Gläser ergibt sich bei Messungen an Proben unter dem Gefrierpunkt der Meßlösung. Dann ist es wichtig, daß die Proteine nicht durch sich ausbildende Wasserkristalle zerstört werden. Bei

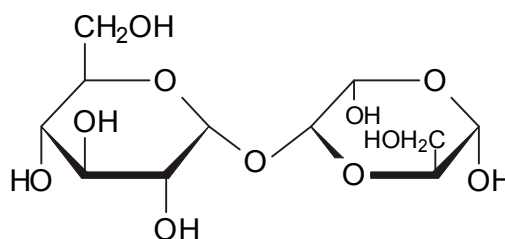


Abb. 3.12: Struktur von  $\alpha,\alpha$ -Trehalose

optischen Messungen kommt hinzu, daß die Probe transparent bleiben muß. Bei Untersuchungen über Strukturänderungen in der Probe während bestimmter Reaktionen dient der Glaszustand mit seiner hohen Viskosität dazu, Konformationsänderungen nicht mehr zuzulassen und damit die entsprechenden Reaktionen zu blockieren. Raumtemperaturgläser ermöglichen Untersuchungen als Funktion der Temperatur bis weit unter den Gefrierpunkt, ohne daß beim Phasenübergang in den Glaszustand ein sprunghaftes Verhalten der Reaktionsgeschwindigkeit auftritt. In unserem Fall dient der Glaszustand dazu, Reaktionen zu verhindern, bei denen die Reaktanden durch Diffusion zueinander gelangen müssen. Aufgrund der extrem hohen Viskosität von  $10^{13}$  poise ist die Beweglichkeit der Moleküle in einem Glas nahezu null.

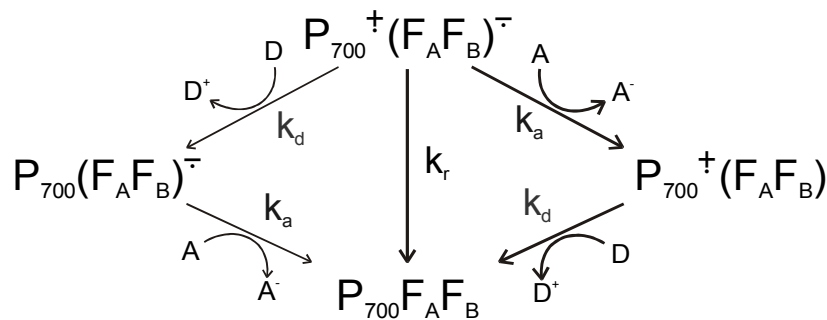
Das von mir verwendete glasbildende Reagenz Trehalose (Abb. 3.12) spielt eine besondere Rolle bei dem biologischen Phänomen der Anhydrobiose. Sie ist die Fähigkeit einiger Organismen (Bäckerhefe, *Artemia salina* (Garnelenart)), lange Zeiträume im dehydratisierten Zustand zu überleben [62, 63]. Trehalose wurde in vielen dieser Organismen in hoher Konzentration gefunden. Green und Angell [64] nehmen an, daß der Glasübergang in Trehalose dem Schutz der Membranen und Proteine vor Zerstörung oder Denaturierung unter wasserfreien Bedingungen dient. Versuche mit Trehalose haben in vitro gezeigt, daß die Widerstandsfähigkeit empfindlicher Enzyme gegen Verlust der Struktur oder Aktivität bei Dehydratisierung oder auch erhöhten Temperaturen stark steigt [62, 63, 65]. Zusätzlich geht man davon aus, daß Trehalosegläser keine störende Wechselwirkung mit dem Protein haben. Zur Stabilisierung von Zwischenprodukten bei der Photoreaktion im Rhodopsin wurden ebenfalls Trehalosegläser verwendet [66].

Proben, bei denen das PS I in Trehaloseglas eingebettet ist, wurden durch Dehydratisierung einer konzentrierten Lösung aus PS I, Puffer und Trehalose hergestellt. Die hochkonzentrierte PS I - Lösung wurde zu der Tris-HCL-Pufferlösung (50 mM, pH = 7.0) gegeben, die 0.02 %  $\beta$ -DM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Ascorbat und 0.6 g/ml Trehalose dihydrat enthält, bis die Chl *a* Konzentration 400  $\mu$ M beträgt. Diese Lösung wurde dünn auf dem Boden einer 2 x 2 cm Küvette aufgetragen und in einem Exsikkator (mit oder ohne Vakuum) über Silikagel getrocknet. Diese Arbeitsweise ist angelehnt an die von Hagen et al. [67] beschriebene Methode.

## 4 Kinetiken der Rekombinationsreaktionen

### 4.1 Einführung

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen ist die Charakterisierung der Ladungsrekombination von  $P700^+$  mit den reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren,  $(F_A F_B)^-$  bzw.  $(F_A^- F_B^-)$ . Dazu wurde der Zeitverlauf der blitzinduzierten Oxidation und Rereduktion von P700 unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (unter Zusatz von TMPD und Ascorbat (im Überschuß) als Elektronendonatoren für  $P700^+$ ; ohne Zugabe von Substanzen, die als Elektronendonator bzw. -akzeptor wirken, etc.) durch die Messung der Absorptionsänderung bei 826 nm verfolgt. Die Änderung der Absorption beim Übergang von  $P700^+$  nach P700 wird bei 826 nm bestimmt, obwohl das Absorptionsdifferenzspektrum bei 700 nm eine 10 mal größere Amplitude aufweist (siehe Abb. 3.2 und [33]). Da eine Anregung des PS I nur bis max. 760 nm beobachtet wurde [68], kann das Meßlicht mit Wellenlängen größer 800 nm keine Ladungstrennung mehr verursachen. Eine direkte Beobachtung der einzelnen Eisen-Schwefel-Zentren ist aufgrund der annähernd identischen Absorptionsdifferenzspektren nicht möglich. Die möglichst genaue Bestimmung der Rekombinationskinetiken unter weitestgehend natürlichen Bedingungen ist Grundlage für weitergehende Messungen, bei denen die Änderung der Halbwertszeit und des Anteils der jeweiligen Kinetik mit der Temperatur, dem Redoxpotential und Zusätzen in der Meßlösung Auskunft über die Energetik, den Weg des Elektronentransfers und strukturelle Änderungen am Protein geben können.



*Schema 4.1: mögliche Schritte beim Übergang des angeregten Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$  in den Grundzustand in Abwesenheit von Donatoren und Akzeptoren*

Für die Reaktionen des nicht vorreduzierten mit Blitzlicht angeregten Photosystems I wird ein Verlauf wie im Schema 4.1 angenommen. Die nach der Anregung einfach reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren werden gleichzeitig durch Rekombination mit  $P700^+$  und durch Elektronenabgabe an einen Akzeptor (A) reoxidiert. In Abwesenheit von Elektronenakzeptoren und -donatoren sollte ausschließlich die Ladungsrekombination beobachtet werden.

In Anwesenheit von einem Akzeptor und einem Donator kann die gewünschte Rekombinationsrate  $k_r$  aus den beobachteten Amplitudenanteilen und den dazugehörigen Ratenkonstanten ( $A_s$ ,  $k_s$  für die schnelle und  $A_l$ ,  $k_l$  für die langsame Phase) berechnet werden. Gl. 4.1 bis Gl. 4.5 zeigen die Herleitung der zur Berechnung benötigten Gleichungen. Der schnelle Anteil ist gegeben durch das gleichzeitige Auftreten der direkten Rekombination, der Oxidation der einfach reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren durch den externen Akzeptor und der Reduktion des  $P700^+(F_A F_B)^-$  durch den externen Donator (Schema 4.1, linker Weg). Der langsame Anteil ist lediglich durch die Rereduktion des  $P700^+ F_A F_B$  bestimmt; die Reoxidation des  $P700(F_A F_B)^-$  kann vernachlässigt werden, da sie zum einen bei 826 nm nicht detektiert wird und zum anderen der Transfer des Elektrons zum Akzeptors in unserem Fall viel schneller, ist als die Einspeisung des Elektrons durch den Donator.

Herleitung der Gl. 4.5 unter der Annahme, daß Donator und Akzeptor im Überschuß vorhanden sind und damit eine Reaktion quasi erster Ordnung vorliegt.  
Für eine Reaktion quasi erster Ordnung gilt:  $k'_a = k_a \cdot [A]$  und  $k'_d = k_d \cdot [D]$

$$\text{Mit } [P700^+](t) = [P700^+(F_A F_B)^-]_0 \cdot \left[ \frac{k_r}{k_r + k'_a} \right] \cdot e^{-(k_r + k'_a + k'_d)t} + [P700^+(F_A F_B)^-]_0 \cdot \left[ \frac{k'_a}{k_r + k'_a} \right] \cdot e^{-k'_d t} \quad \text{Gl. 4.1}$$

gilt nach dem Lambert Beerschen Gesetz:

$$\Delta A(t) = \Delta A_0 \cdot \left[ \frac{k_r}{k_r + k'_a} \right] \cdot e^{-(k_r + k'_a + k'_d)t} + \Delta A_0 \cdot \left[ \frac{k'_a}{k_r + k'_a} \right] \cdot e^{-k'_d t} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Die Funktion, die an den zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung angepaßt wurde, lautet:

$$\Delta A(t) = \Delta A_s \cdot e^{-k_s t} + \Delta A_l \cdot e^{-k_l t} \quad \text{Gl. 4.3}$$

mit  $k_s = k_r + k'_a + k'_d$  und  $k_l = k'_d$  (für  $k_r + k'_a \gg k'_d$ )

Aus Gl. 4.2 und Gl. 4.3 folgt:

$$\Delta A_s = \Delta A_0 \cdot \left[ \frac{k_r}{k_r + k'_a} \right], \text{ mit } k'_a = k_s - k_l - k_r \quad \text{Gl. 4.4}$$

und nach Auflösung nach  $k_r$ :

$$k_r = \left( \frac{A_s}{A_s + A_l} \right) (k_s - k_l), \text{ mit } \Delta A_0 = A_s + A_l \quad \text{Gl. 4.5}$$

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

### 4.2.1 Kinetik der Rekombination von $P700^+$ mit $(F_A F_B)^-$

#### 4.2.1.1 PS I in wässriger Lösung

Da die Präparation der PS I-Komplexe nicht bei vollständiger Dunkelheit erfolgt, liegt P700 in den Stammlösungen in der Regel teilweise oxidiert vor. Damit P700 in der Meßlösung vor der Blitzanregung vollständig reduziert ist, wird typischer Weise ein Elektronendonator zugegeben. Es wurde eine Kombination von 5 mM Ascorbat ( $E_{m,pH\ 7.0} = +60\text{ mV}$ ) und 200  $\mu\text{M}$  TMPD ( $E_m = +260\text{ mV}$ ) verwendet. Durch Ascorbat im Überschuß sollte TMPD vollständig reduziert sein, so daß ein Abgreifen der Elektronen von den terminalen Eisen-Schwefel-Zentren nicht möglich sein sollte. Abb. 4.1 zeigt den unter diesen Bedingungen gemessenen zeitlichen Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm. Für eine zufriedenstellende Anpassung des Zeitverlaufes sind zwei Exponentialfunktionen notwendig. Die Anpassung liefert folgende Halbwertszeiten mit relativen Amplituden: 22 ms (25 %) und 370 ms (75 %).

Der langsame Anteil wird der Reduktion von  $P700^+$  durch TMPD zugeordnet, da die Halbwertszeit proportional zur TMPD-Konzentration ist (nicht gezeigt). Entsprechend dem Schema 4.1 wird die schnelle Phase mit der Halbwertszeit von 22 ms dem Zerfall von  $P700^+(F_A F_B)^-$  zugeordnet. Die Zweiphasigkeit zeigt, daß  $k_a$  ungleich null ist, obwohl kein

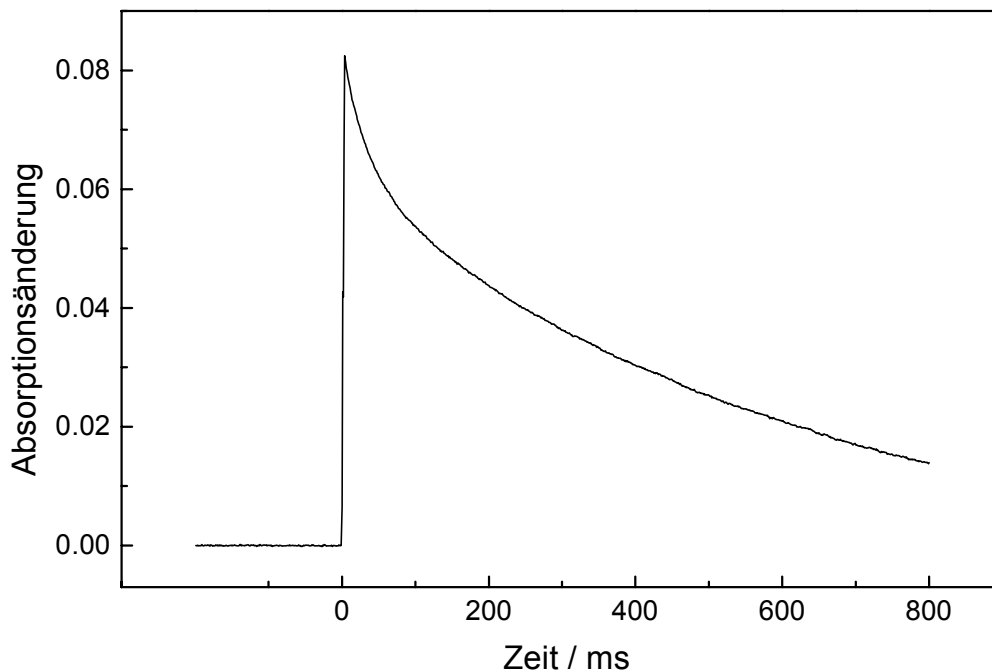


Abb. 4.1: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
Meßbedingungen: 5 mM Asc, 200  $\mu\text{M}$  TMPD.

externer Akzeptor zugesetzt wurde. Weiterhin kann aus der relativen Amplitude der langsamen Phase von 75 % berechnet werden, daß  $k_a$  ungefähr 3 mal größer als  $k_r$  ist. Damit berechnet man anhand der Gl. 4.5 eine Halbwertszeit für die Rekombination mit  $t_{1/2} = \ln 2/k_r = 88$  ms. Weitere Experimente deuten darauf hin, daß sowohl oxidiertes Ascorbat, als auch Reste von oxidiertem TMPD oder aus der Luft gelöster Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungieren. Die Konzentration des oxidierten TMPD ist nicht zu vernachlässigen, da an einer frisch zubereitete Pufferlösung mit 5 mM Asc und 200  $\mu$ M TMP ein Redoxpotential um 80 mV gemessen wurde. Bei diesem Potential liegen ca. 0.2  $\mu$ M TMPD vor. Diese Konzentration liegt in der Größenordnung der Reaktionszentren.

Um die Oxidation von  $(F_A F_B)^{\cdot -}$  durch Elektronenakzeptoren zu minimieren, wurden Experimente unter aeroben und anaeroben Bedingungen ohne Zugabe von Elektronendonatoren durchgeführt.

Um gleichzeitig sicherzustellen, das P700 reduziert vorliegt, wurde die Stammlösung mit 1 mM Dithionit versetzt. Überschüssiges Dithionit wurde in vollständiger Dunkelheit mit Luftsauerstoff oxidiert. Die PS I-Probe wurde dann im Dunkeln mit der Meßlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Damit es zu keiner Anregung durch das Meßlicht oder Restlicht aus der Umgebung kommt, befand sich die Küvette in einem schwarzen Gehäuse, dessen Öffnungen im Strahlengang mit RG 780 Filtern verschlossen waren. Zum zweiten befand sich vor der Küvette im Strahlengang ein zusätzliches Interferenzfilter (PAL 820), um Anregungen durch das Meßlicht auszuschließen. Die unter diesen Bedingungen gemessene Signalamplitude nach dem ersten Blitz lag bei 90 % bis 100 % der Maximalamplitude, die in Anwesenheit von 5  $\mu$ M PMS und 5 mM Ascorbat bestimmt wurde.

In Anwesenheit von Luftsauerstoff wird ein Redoxpotential um +150 mV gemessen. Dieses Potential, sowie die anderen in diesem Kapitel angegebenen Potentiale können nur Näherungswerte sein, da sich das Redoxpotential ohne Mediatoren nicht präzise messen läßt [69]. Abb. 4.2 zeigt den zeitlichen Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung nach dem 1. Blitz (schwarze Linie) und das Signal nach ca. 70 repetierenden Blitzen mit 1 Hz (grüne Linie). Der Zeitverlauf nach dem 1. Blitz läßt sich durch eine exponentielle Phase mit einer Halbwertszeit von 64 ms (62 %) und einen nahezu konstanten Anteil ( $t_{1/2} > 100$  s) von 38 % anpassen.

Die Amplitude des konstanten Anteils schwankt für unterschiedliche Präparationen zwischen 35 % und 45 %. Dies bedeutet, daß auch unter diesen Bedingungen in ca. 40 % aller Zentren das Elektron von  $(F_A F_B)^{\cdot -}$  durch einen Elektronenakzeptor abgegriffen wird. Die Folge ist, daß P700<sup>+</sup> in diesen Zentren oxidiert bleibt, bzw. nur extrem langsam rereduziert wird. In

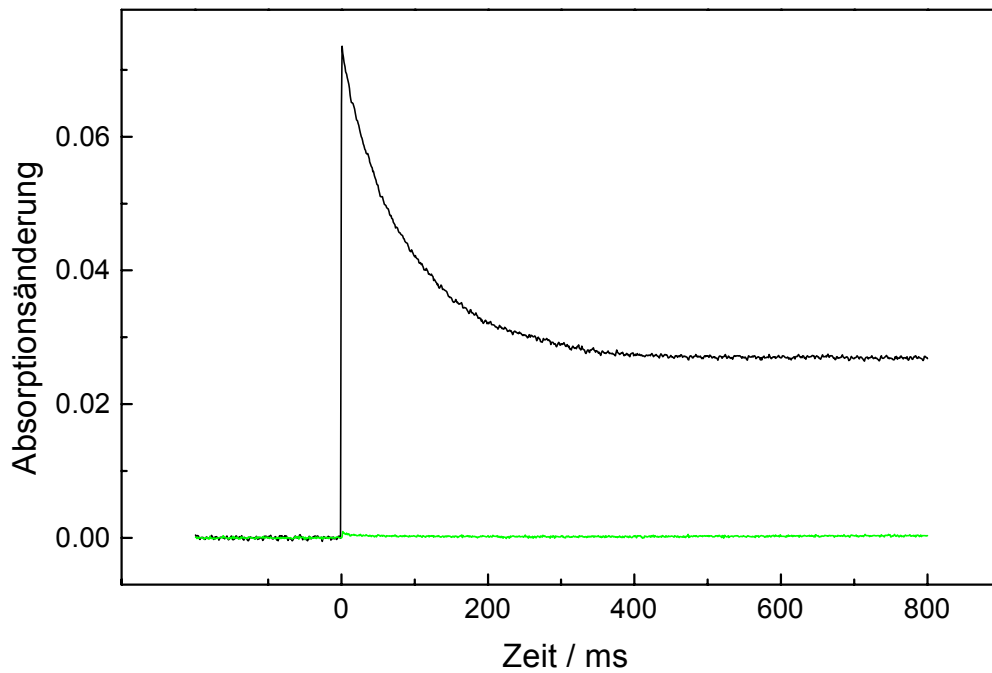


Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*, aerobe Bedingungen  
 Meßbedingungen: schwarze Linie: pH=7.0, 1. Blitz; grüne Linie: Signal nach ca. 70 repetierenden Blitzen mit 1 Hz.

einer Folge von Blitzen wird  $P700^+$  daher akkumuliert und die Signalamplitude geht bei repetierender Anregung gegen null. Aus den erhaltenen Werten berechnet man anhand der Gl. 4.5 ein  $t_{1/2}$  von 103 ms für die Ladungsrekombination.

Um das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Rekombination  $k_r$  und den Transfer auf einen Akzeptor  $k_a$  präzise zu ermitteln, wurde die Abnahme der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm mit zunehmender Blitzzahl analysiert. Dazu wurden die Proben (Abb. 4.3) bei einer Wiederholrate von 1 Blitz pro 30 Sekunden mit sättigenden Blitzen angeregt. Die Abnahme der Amplitude resultiert aus der zunehmenden Akkumulation von langlebigen  $P700^+$  mit fortschreitender Blitzzahl. Dem Schema 4.1 zufolge sollte die Amplitude der Absorptionsänderung, die durch den n-ten Blitz hervorgerufen wird, sich wie folgt berechnen:

$$\Delta A_n = \left( \frac{k_r}{k_r + k_a} \right)^{n-1} \Delta A_1 \quad \text{Gl. 4.6}$$

$k_r$  = Geschwindigkeitskonstante der Ladungsrekombination von  $P700^+(F_A F_B)^-$

$k_a = \sum_{i=1}^p k_{ai}$  mit  $p$  = Anzahl der Akzeptoren, die  $(F_A F_B)^-$  in Konkurrenz zur Rekombination mit der jeweiligen Geschwindigkeitskonstante  $k_{ai}$  oxidieren



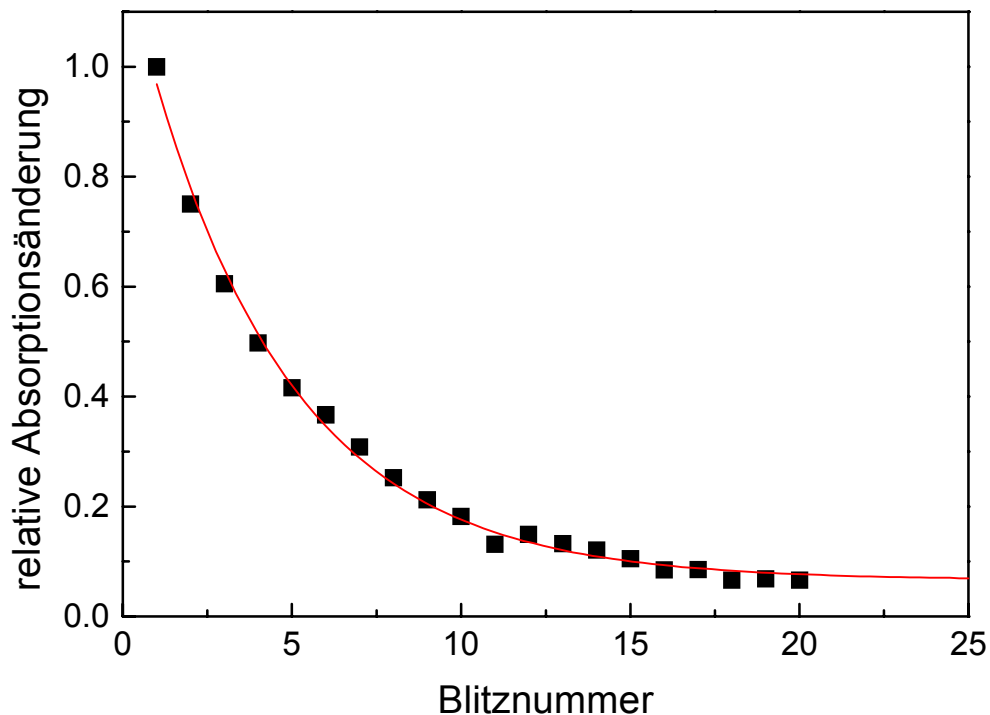


Abb. 4.3 Abnahme der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm als Funktion der Blitzzahl bei Anregung mit sättigenden Blitzen mit einer Anregungsrate von 1 Blitz / 30 Sekunden unter aeroben Bedingungen. Die eingezeichnete Kurve stellt die beste Anpassung mit der Funktion:  $\Delta A_n = \Delta A_1 \exp(-\ln(y+1)(n-1)) + p$  dar, mit den Parametern:  $y = 0.264$  und  $p = 0.06$ .

Die Gleichung kann als Exponentialfunktion geschrieben werden:

$$\Delta A_n = \Delta A_1 \cdot \exp(-\ln(y+1)(n-1)) \text{ mit } y = \frac{k_a}{k_r} \quad \text{Gl. 4.7}$$

Die Gleichung ist jedoch nicht ausreichend um die experimentellen Befunde zu beschreiben, da die Anfangsamplituden nicht auf null zurückgehen. Der bestehenbleibende Anteil läßt sich damit begründen, daß es bei einer Blitzfolge von einem Blitz pro 30 Sekunden bereits wieder zu einer Einspeisung von Elektronen in das P700<sup>+</sup> kommt. Die Kurve in Abb. 4.3 ist dementsprechend die beste Anpassung mit einer Summe aus einer Exponentialfunktion und einer Konstanten (p). Damit ergeben sich für die Messungen in Anwesenheit von Luftsauerstoff die Werte  $y = 0.264$  und  $p = 0.06$ .

Um zu überprüfen, in welchem Umfang gelöster Sauerstoff als Akzeptor wirkt, wurden vergleichende Messungen an sauerstofffreien Lösungen durchgeführt. Sauerstoff kommt thermodynamisch als Akzeptor in Frage, da das Halbstufenpotential für die Bildung des Superoxidanions bei -330 mV liegt [85] und damit positiver ist als die Halbstufenpotentiale

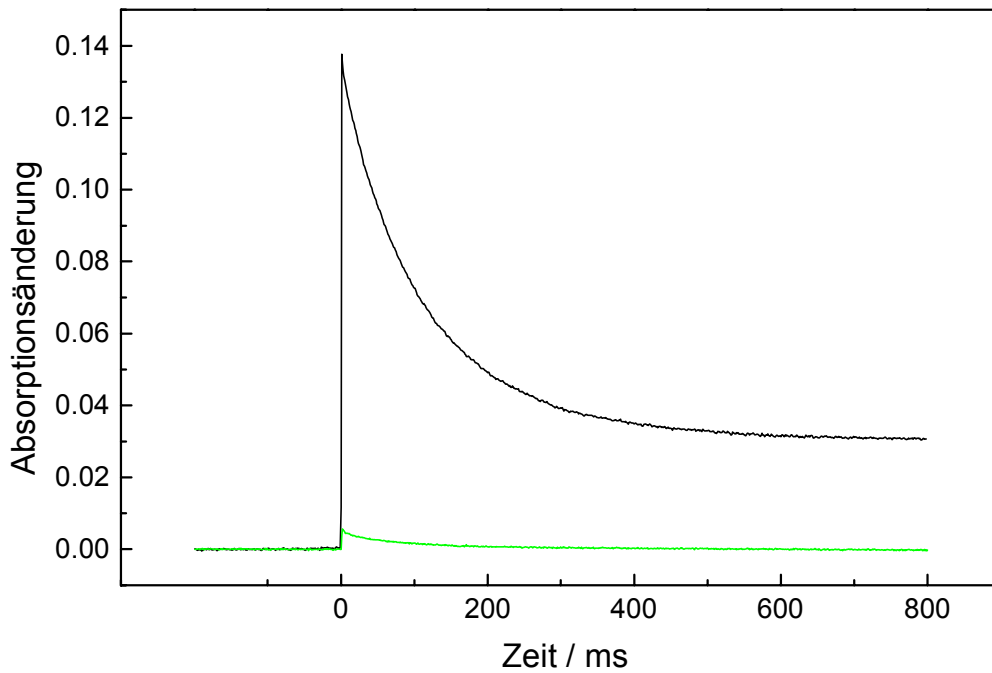


Abb. 4.4: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
 Meßbedingungen: schwarze Linie: pH=7.0, anaerobe Bedingungen, 1. Blitz;  
 grüne Linie: Signal nach ca. 70 repetierenden Blitzen mit 1 Hz.

der Eisen-Schwefel-Zentren. Um den Sauerstoff aus der Lösung zu verdrängen, wurde Argon durch den probenfreien Puffer durchgeleitet und nach Zugabe der Probe zum Schutz des Proteins nur noch übergeleitet. Die Dauer des Entgasens lag durchschnittlich bei 3 Stunden. Das verwendete Argon der Reinheitsklasse 4.8 wurde mit einer Oxysorbpatrone der Firma Messer Griesheim nachgereinigt. Diese auf der Hochdruckseite eingebaute Patrone reduziert den Sauerstoff auf eine maximale Restkonzentration von weniger als 1 ppb.

Abb. 4.4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung nach dem 1. Blitz und nach ca. 70 repetierenden Blitzen unter anaeroben Bedingungen. Die Anpassung ergibt eine exponentielle Komponente mit einer Halbwertszeit von 79 ms (76 %) und eine Konstante von 24 %. Aus dem Ergebnis folgt, daß Sauerstoff als alleiniger Elektronenakzeptor ausscheidet.

Aus den erhaltenen Werten berechnet man anhand der Gl. 4.5 eine Halbwertszeit  $t_{1/2} = \ln 2/k_r$  von 104 ms.

Im Folgenden wurde versucht, die Geschwindigkeit der  $P700^+$ -Rereduktion des in PS I-Komplexen zu bestimmen, bei denen das  $(F_A F_B)^-$  bereits reoxidiert wurde. Hierzu wurden die Zentren zunächst mit einer Serie von Blitzen vollständig geschlossen. Nach dem letzten Blitz wurde eine diskrete Zeit gewartet und dann der Transient nach dem ersten Blitz aufgezeichnet, um anhand der Anfangsamplitude zu erkennen, wieviel Prozent der Zentren wieder im Ausgangszustand vorgelegen haben. Anschließend wurden die Zentren erneut durch eine

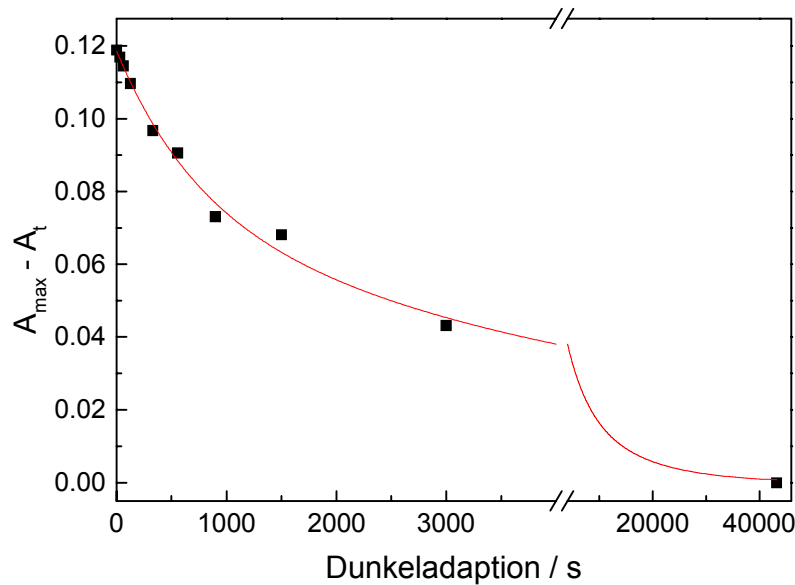


Abb. 4.5: Differenz der maximalen Anfangsamplitude und der Anfangsamplitude gegen die Zeit der Dunkeladaption

Meßbedingungen: anaerobe, die Probe wird mit 40 - 70 Blitzen mit einer Rate von 1 Hz geschlossen, anschließend wird sie für die angegebene Zeit dunkeladaptiert und das Signal mit einem Blitz aufgezeichnet

Serie von Blitzen geschlossen und die Aufzeichnung des Transienten zu einem anderen Zeitpunkt wiederholt. Die so gewonnenen Anfangsamplituden sind in Abb. 4.5 gegen die Zeit der Dunkeladaption aufgetragen.

Um das Verhältnis von  $k_r$  zu  $k_a$  unter anaeroben Bedingungen zu bestimmen, wurde wiederum die Abnahme der blitzinduzierten Anfangsamplitude mit zunehmender Blitzzahl analysiert (siehe Abb. 4.6). Die beste Anpassung mit Gl. 4.7 ergibt  $y = 0.187$  und  $p = 0.2$ . Diese Werte wurden mit einer Blitzrate von 1 Blitz pro 30 Sekunden aufgezeichnet. Innerhalb der 30 Sekunden wird das  $P700^+$  bereits teilweise wieder rereduziert, wodurch sich ein stationärer Zustand einstellt. Dieser Zustand ist dadurch gekennzeichnet, daß die Amplitude bei einem Blitzabstand von 30 Sekunden nur auf ein Minimum von 20 % zurückgeht. Daraus läßt sich eine Geschwindigkeitskonstante für die langsame Reduktion des  $P700^+$  abschätzen.

Bei einer effektiven Rate für die  $P700$ -Oxidation von 1 pro 150 Sekunden\* ergibt sich eine Rate für die Reduktion von 1 pro 10 Minuten, was in einer guten Übereinstimmung mit einer direkten Bestimmung der sehr langsamen Reduktionskinetik (siehe Abb. 4.5) ist. Der geringere Wert von  $p = 0.06$  unter aeroben Bedingungen deutet darauf hin, daß in Anwesenheit von Luftsauerstoff die Rereduktion wesentlich langsamer erfolgt. Dies läßt sich dadurch

\* Die effektive Rate ergibt sich aus einer Anregung pro 30 Sekunden und einer Wahrscheinlichkeit von  $\approx 0.2$ , daß nach dem Blitz der Zustand  $P700^+F_A F_B$  erzeugt wird.

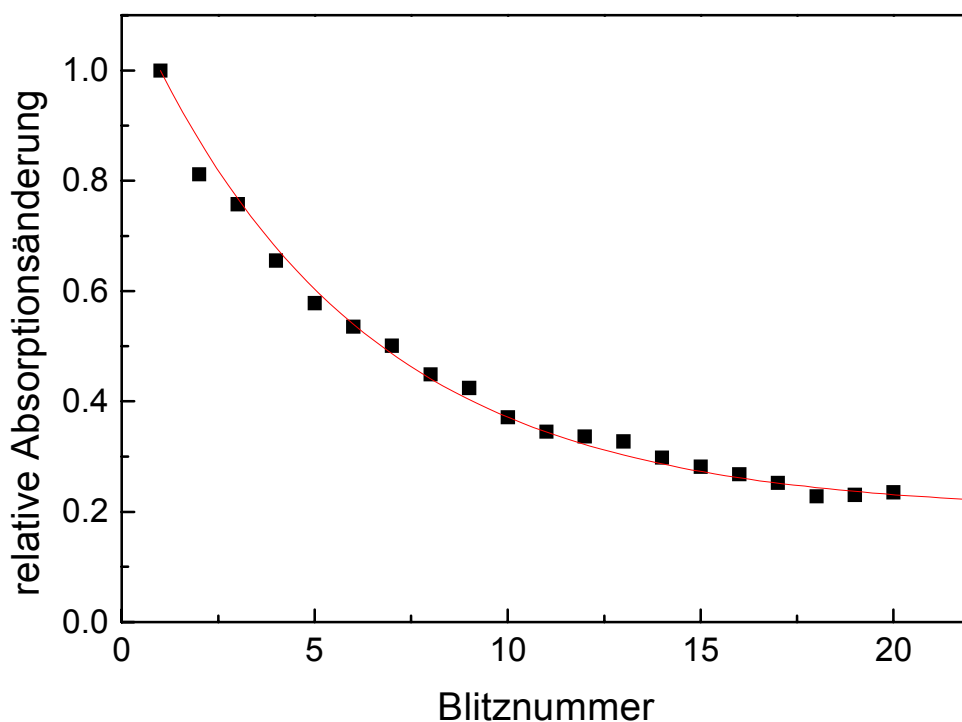


Abb. 4.6 Abnahme der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm als Funktion der Blitzzahl bei Anregung mit sättigenden Blitzen mit einer Anregungsrate von 1 Blitz / 30 Sekunden unter anaeroben Bedingungen. Die eingezeichnete Kurve stellt die beste Anpassung mit der Funktion:  $\Delta A_n = \Delta A_1 \exp(-\ln(y+1)(n-1)) + p$  dar, mit den Parametern:  $y = 0.187$  und  $p = 0.2$ .

erklären, das Sauerstoff in einer Reihe von Schritten zu  $\text{OH}^-$  reduziert wird, das nicht mehr zur Rereduktion von  $\text{P700}^+$  beiträgt.

Die Ratenkonstante für den Elektronentransfer von den reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren auf den Sauerstoff läßt sich aus der Differenz zwischen  $k_a$  in Anwesenheit und  $k_a$  in Abwesenheit von Luftsauerstoff berechnen. Die Berechnung der  $k_a$ -Werte aus den  $y$ -Werten ( $y = k_a/k_r$ ) ergibt bei Halbwertszeiten von  $t_{1/2} = 85$  ms bis  $t_{1/2} = 105$  ms für die Rekombination ein  $k_{\text{Sauerstoff}}$  von  $2500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bis  $2000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Dieser Wert liegt deutlich unter dem von Asada et al. [82] veröffentlichtem Wert von  $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Dies liegt daran, daß Asada et al. nicht den direkten Elektronentransfer auf den Sauerstoff beobachten konnten, sondern lediglich die Reduktion des Sauerstoff über die Zwischenstufe des Ascorbylradikals, wie im Kapitel 4.2.2 gezeigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, welche Komponenten neben Sauerstoff für die reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren als Akzeptor wirken. Es konnten keine Meßbedingungen gefunden werden, bei denen der Anteil der sehr langsamen Kinetik niedriger als 20 % lag. Untersuchungen als Funktion des pH-Wertes ergaben eine leichte Tendenz, daß bei geringeren pH-Werten ein geringerer Anteil an sehr langsamer Kinetik vorhanden war.

Zusätzlich zur Sauerstoffentfernung mit Argon wurde versucht, den Sauerstoff enzymatisch abzubauen. Für die biologische Entfernung von Sauerstoff aus Meßlösungen wird ein System verwendet, bei dem Sauerstoff durch die enzymatische Wirkung der Glucoseoxidase/Catalase (GOD) reduziert wird. Diesem System liegen die zwei folgenden Reaktionsschritte zu Grunde:



Die Glucoseoxidase/Catalase wird bei Arbeiten mit Proteinen häufig dazu verwendet, den Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen, wenn kein Inertgas über oder durch die Lösung geleitet werden kann. Die Anwendung von Inertgasen soll vorwiegend dann vermieden werden, wenn ein Durchleiten von Gasblasen zu einer Zerstörung des Proteins führt und beim Überleiten eine vollständige Entfernung des Sauerstoffs nicht gewährleistet ist. Nachteilig ist, daß die D-Gluconsäure seinerseits reduziert werden kann.

Die Meßlösung wurde, wie zuvor beschrieben angesetzt, und die GOD hinzugefügt. Die Endkonzentration der Komponenten beträgt 5 mM Glucose, 10 units/ml GOD und 140 units/ml Catalase. Die Einheit units/ml bezieht sich darauf, wieviel Mikromole Substrat pro Minute und Milliliter umgesetzt werden. Die Konzentration der Catalase ist bewußt wesentlich höher gewählt worden, um das als störendes Zwischenprodukt auftretende  $\text{H}_2\text{O}_2$  schnell und wirksam zu zersetzen. Zudem wird die Catalase als erste Komponente des GOD hinzugegeben, um einen Anstieg der Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  von vornherein verhindern.

Im Rahmen der Meßgenauigkeit wird der Sauerstoff aus der Lösung in der geschlossenen Küvette vollständig entfernt. Es gelingt jedoch auch auf diese Weise nicht, die Reoxidation von  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  durch externe Akzeptoren zu verhindern. Eine Ladungsrekombination zwischen  $\text{P700}^+$  und  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  findet wiederum nur in ungefähr 75 % der Zentren statt. Diese Ergebnis unterstützt den oben beschriebenen Befund, daß  $\text{O}_2$  nur in geringem Maße als direkter Akzeptor fungiert.

#### 4.2.1.2 PS I im organischen Glas

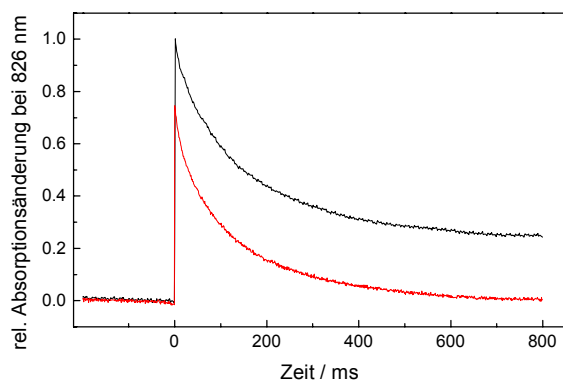
Damit ein externer Akzeptor  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  oxidieren kann, muß diese durch Diffusion zu dem reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum  $\text{F}_\text{B}^-$  gelangen, um dort das Elektron abzugreifen. Überführt man die Probe in den Glaszustand, steigt die Viskosität um mehrere

Größenordnungen an. Dies müßte einen externen Akzeptor am Erreichen des  $F_B^-$  hindern und somit die sehr langsame Kinetik unterdrücken.

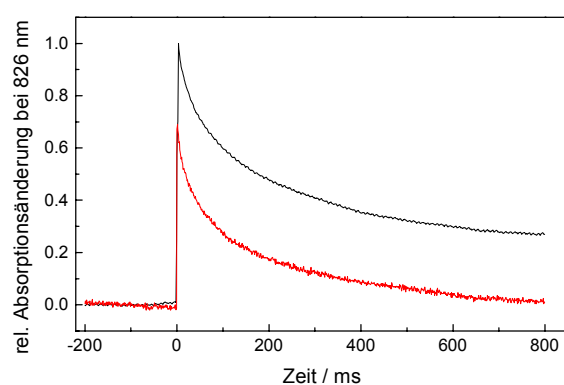
Um zu überprüfen, inwieweit die Viskositätsänderung einen Einfluß auf das Rekombinationsverhalten im PS I hat, wurden Proben in Trehaloseglas eingebettet. Die exakten Arbeitsschritte und Konzentrationen sind im Kapitel 3.7 beschrieben.

Neben dem für diese Arbeit hergestellten Trehaloseglas standen zusätzlich PS I Proben zur Verfügung, die in glasartigem Polyvinylalkohol fixiert waren. Diese Proben wurden von Dr. Bettina Hillmann zur Verfügung gestellt. Da sie jedoch zu einem anderen Zweck präpariert wurden, enthalten sie neben Ascorbat auch Hydrochinon.

Bei beiden Proben wurden der Zeitverlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung im üblichen Aufbau bei 826 nm bestimmt. Die Messungen wurden in verschiedenen Zeitfenstern mit und ohne Vorblitze durchgeführt.



*Abb. 4.7: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von in Polyvinylalkohol eingebettetem trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
Meßbedingungen: schwarze Linie: vier gemittelte Einzelmessungen, die im Abstand von 2 Minuten aufgezeichnet wurden; rote Linie: nach 40 repetierenden Blitzen mit ca. 1 Hz.*



*Abb. 4.8: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von in Trehalose eingebettetem trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
Meßbedingungen: schwarze Linie: vier gemittelte Einzelmessungen, die im Abstand von 2 Minuten aufgezeichnet wurden; rote Linie: nach 40 repetierenden Blitzen mit ca. 1 Hz.*

Bei beiden Messungen resultiert ein Anteil von 24 % der sehr langsamen Kinetik. Dies legt die Vermutung nahe, daß das Hydrochinon bei den Messungen in Polyvinylalkohol keinen störenden Einfluß hat. Bei der in Trehalose eingebetteten Probe ist eine sehr schnelle Kinetik ( $\sim 300 \mu s$ ) mit 6 % der Gesamtamplitude zu beobachten, die aber nur gut doppelt so groß ist, wie in der Trehaloselösung und damit mit einer normalen Alterung zusammenhängen kann (siehe Gütekontrolle der Proben unter 3.1).

Nach einer Serie von schnell aufeinanderfolgenden Vorblitzen, sinkt die Anfangsamplitude bei den Messungen mit Polyvinylalkohol um 22 % ab und bei denen mit Trehalose um 30 %. Dies ist erheblich weniger als bei entsprechenden Untersuchungen in Lösung und entspricht nahezu dem zuvor beobachteten Anteil an sehr langsamer Kinetik. Dies kann dadurch erklärt werden, daß es im Glas eine Heterogenität zwischen Zentren gibt, in denen das Elektron von den terminalen Eisen-Schwefel-Zentren zu einem Akzeptor der sich in der Nähe befindet, transferiert wird und Zentren, in denen nach jedem Blitz die Ladungsrekombination erfolgt. Wenigstens zwei mögliche Ursachen lassen sich vermuten:

1. Bei 24 % der Zentren hat sich ein externer Akzeptor zum Zeitpunkt des Glasüberganges in Reichweite für die Elektronen der reduzierten terminalen Eisen-Schwefelzentren befunden. Bei diesen Zentren geht das Elektron nach der Blitzlichtanregung auf diesen Akzeptor über. Da der Akzeptor seine Position nicht ändern kann, kommt es zu einer sehr langsamen Rekombination, so daß der Akzeptor nach einer längeren Ruhezeit wieder oxidiert vorliegt, was die Reproduzierbarkeit der Messungen erklärt. Bei den anderen Zentren ist kein externer Akzeptor erreichbar, so daß es zu einer vollständigen Rekombination kommt. Da durch die Viskosität der Probe kein neuer Akzeptor herandiffundieren kann, rekombinieren diese Zentren auch bei den Folgeblitzen immer wieder.
2. Durch den Glaszustand werden unterschiedliche Konformationen des Proteins eingefroren. 24 % der so fixierten Proteine unterscheiden sich von den restlichen 76 % darin, daß sie das Elektron nicht auf einen Elektronenakzeptor transferieren können, der auf die terminalen Eisen-Schwefel-Zentren folgt. Da sich im Gegensatz zur Lösung im Glas auch bei den Konformationszuständen keine Änderung mehr ergibt, rekombinieren die Zentren, die auch schon bei der ersten Blitzlichtanregung kein Elektron verloren haben immer wieder.

Da in 20 % bis 30 % der PS I-Komplexe aus *Synechococcus elongatus* nach der Ladungstrennung  $(F_A F_B)^-$  durch eine Komponente X reoxidiert wird und sich diese Komponente nicht durch das Einleiten von Argon entfernen läßt, wird im folgenden versucht, diesen Akzeptor kontrolliert vorzureduzieren.

Hierzu wird die Meßlösung in der in Abb. 3.7 dargestellten Küvette vorgelegt und der Sauerstoff durch Überleiten von nachgereinigtem Argon unter Rühren entfernt. Anschließend wird langsam unter regelmäßiger Kontrolle der blitzinduzierten Absorptionsänderung und Messen des Redoxpotentials eine 20 mM Dithionitlösung hinzugegeben, bis das Signal keine sehr langsame Kinetik mehr aufweist und weitestgehend monoexponentiell abfällt.

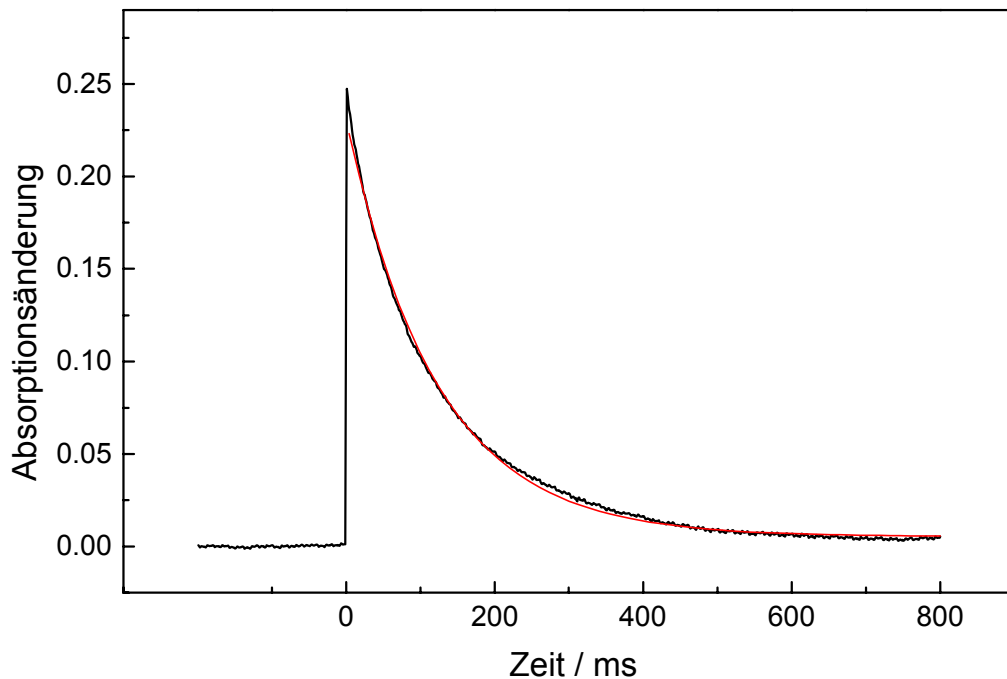


Abb. 4.9: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
 Meßbedingungen: schwarze Linie: 33  $\mu\text{M}$  Chl a, pH=6.5, anaerobe Bedingungen, mit Dithionit eingestelltes Redoxpotential auf ca. -250 mV; rote Linie: monoexponentielle Anpassung mit  $t_{1/2} = 85 \text{ ms}$

Abb. 4.9 zeigt den gemessenen Zeitverlauf der  $\text{P700}^+$  Reduktion bei einem Potential von ungefähr -250 mV. Unter diesen Bedingungen ist der Zerfall nahezu monoexponentiell mit einer Halbwertszeit von 85 ms. Es sei an dieser Stelle erneut darauf hingewiesen, daß die Bestimmung von Redoxpotentialen ohne Mediatoren immer nur einen Näherungswert liefern kann.

#### 4.2.1.3 Diskussion

Die unterschiedlichen oben beschriebenen Ansätze ergaben für die Ladungsrekombination zwischen  $\text{P700}^+$  und  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  eine Halbwertszeit von  $(95 \pm 10) \text{ ms}$ . Die Schwankungen der Einzelwerte können auf folgende Ursachen zurückzuführen sein:

1. Eine geringe Schwankung der ermittelten Halbwertszeiten wurde unter gleichen Bedingungen an unterschiedlichen Proben beobachtet. Dies könnte auf geringe Unterschiede in der Präparation zurückzuführen sein. Mögliche Einflüsse sind die Menge des in das Protein eingelagerten Wassers, das Alter der Probe und Vollständigkeit der Detergenzhülle.
2. Eine reproduzierbare Zunahme der Halbwertszeit wurde mit der Alterung der Probe in Zeiträumen über 12 Stunden beobachtet.



3. Die durchschnittlich etwas geringer gemessene Halbwertszeit für die Rekombination unter Vorreduktion mit Dithionit wird durch das Einspeisen des reduzierten Dithionits und seiner Zerfallsprodukte mit einem Potential  $< 400$  mV in das  $P700^+$  hervorgerufen.

Die Untersuchungen zur Rereduktion des  $P700^+$  aus dem Zustand  $P700^+F_AF_B$  (Abb. 4.5) zeigen, daß sich der Verlauf der Meßpunkte nicht monoexponentiell anpassen läßt. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der Rereduktion des  $P700^+$  nicht um eine Reaktion 1. Ordnung, sondern um eine Reaktion 2. Ordnung handelt. Eine Möglichkeit dafür wäre, daß der Akzeptor, der die Elektronen vom  $(F_AF_B)^-$  abgegriffen hat, auch wieder in das  $P700^+$  einspeist. Wenn beide Reaktionspartner annähernd in gleicher Konzentration vorliegen, läßt sich die Ratenkonstante 2. Ordnung wie folgt bestimmen:

$$\frac{c_0 - c_t}{c_0 \cdot c_t} = kt \quad \text{Gl. 4.10}$$

$c_0$  = Anfangskonzentration an  $P700^+$  = eingesetzte P700-Konzentration

$c_t$  = Konzentration von  $P700^+$  zum Zeitpunkt t

Trägt man nun mit  $(c_0 - c_t) / (c_0 \cdot c_t)$  gegen die Zeit auf und paßt eine Geradengleichung mit  $y(0) = 0$  an, erhält man die Ratenkonstante 2. Ordnung. Aus der Abb. 4.10 ergibt sich so ein k von  $(3850 \pm 100) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine extrem langsame Reduktion von  $P700^+$ . Bereits

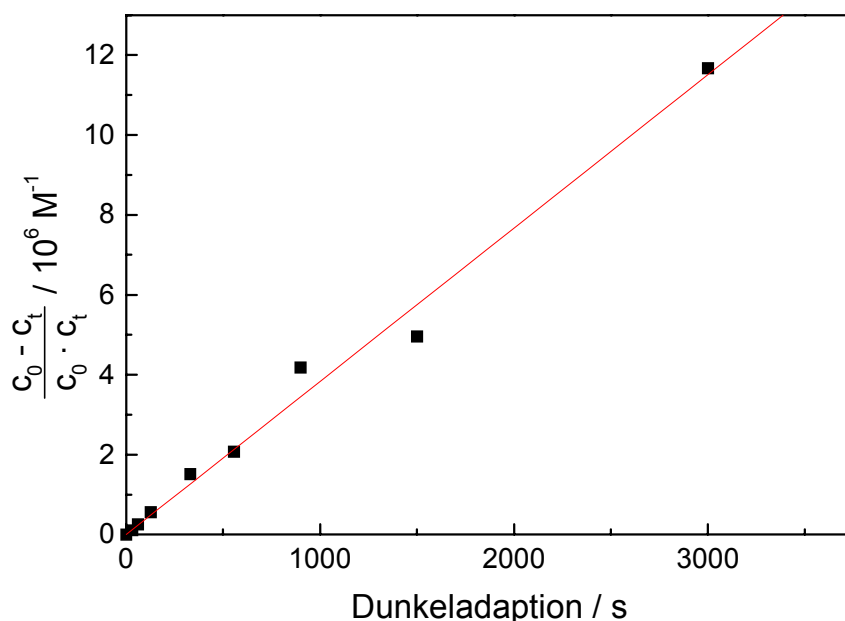


Abb. 4.10:  $[P700]_t / ([P700^+]_t [P700^+]_0)$  gegen die Zeit der Dunkeladaption  
 Meßbedingungen: anaerob, die Probe wird mit 40 - 70 Blitzen mit einer Rate von 1 Hz geschlossen, anschließend wird sie für die angegebene Zeit dunkeladaptiert und das Signal mit einem Blitz aufgezeichnet; rote Linie: lineare Anpassung mit  $y(0) = 0$

1978 haben Ke et al. [70] an TSF-I-Teilchen bei Raumtemperatur nach langem Belichten eine Rekombinationskinetik mit einer Halbwertszeit um 65 s beobachtet. Bei diesen Untersuchungen wurden keine künstlichen Donatoren oder Akzeptoren zugesetzt. In der Arbeit von Sonoike et al. [71] an *Synechococcus elongatus* werden ähnliche Ergebnisse erwähnt, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Die sehr langsame Kinetik mit einem Anteil von ca. 50 % unter aeroben Bedingungen läßt sich durch Entfernen des Sauerstoffs nur verringern, verschwindet aber erst unter Zugabe von Dithionit. Auch hier stellt sich die Frage, ob das Dithionit wirklich nur den überschüssigen Sauerstoff reduziert. Sonoike et al. stellen ebenfalls fest, daß die Zugabe lipophiler Kationen den Anteil der langsamen Kinetik unter aeroben Bedingungen verringert, während die Zugabe lipophiler Anionen ihn erhöht. In der Arbeit von Rousseau et al. [72] an *Synechocystis* wird selbst unter Vakuumbedingungen bis zu 70 % der sehr langsamen Kinetik gefunden. Sauerstoff wird als Akzeptor für die Elektronen, die dem System verloren gehen, von den Autoren aufgrund der strengen Entgasung unter Vakuum ausgeschlossen. Interessant ist auch, daß die Zugabe von Ferredoxin zu Partikeln ohne PsaE-Protein eine Zunahme der langsamen Kinetik zur Folge hat, ohne daß reduziertes Ferredoxin beobachtet wird. Bei den elektrogenen Messungen von Sigfridsson et al. [73] wird davon ausgegangen, daß das Elektron das Protein verläßt, da die gemessene anteilige Amplitude der sehr langsamen Kinetik bei den elektrogenen Messungen nur ca. 35 % des Amplitudenanteils der sehr langsamen Kinetik beträgt, die bei optischen Referenzmessungen bestimmt wurde. Dieser geringere Anteil wird darauf zurückgeführt, daß das Elektron in einen Bereich mit einer höheren Dielektrizitätskonstanten übergegangen ist, was das Signal bei den elektrogenen Messungen abschwächen würde. In der Arbeit von Sétif et al. [74] wurden erstmals umfangreichere Untersuchungen betreffend des Elektronenverlustes durchgeführt. Bei dieser Arbeit ist Ferredoxin an das PS I gebunden, so daß das Elektron nicht von den Eisen-Schwefel-Zentren abgegeben wird, sondern vom Ferredoxin. Dies wird dadurch beobachtet, daß neben 3 Kinetiken für die Reduktion des Ferredoxins eine weitere für seine Reoxidation (no. 4-Phase genannt) auftritt. Um die partielle Reoxidation des  $Fd^+$  zu charakterisieren, wurde eine Reihe von Untersuchungen angestellt:

1. Um gelösten Sauerstoff auszuschließen, wurde die Probe mit GOD versetzt oder zyklisch unter Vakuum eingefroren und aufgetaut. Beides zeigte keine Veränderung.
2. Um oxidiertes DCPIP auszuschließen, wurden Messungen ohne DCPIP mit hohen Ascorbatkonzentrationen und sehr weiten Blitzabständen aufgenommen. Auch dies zeigt keinen Einfluß auf die Reoxidation.

3. Ebenfalls keinen Einfluß auf die no. 4-Phase hat die Verwendung von Dehydroascorbat oder gleichen Anteilen von Dehydroascorbat und Ascorbat.

Die Untersuchungen wurden an verschiedensten Kombinationen der zur Verfügung stehenden biologischen Materialien gemacht. Unter anderem mit aufgelösten Kristallen von PS I aus *Synechococcus elongatus* und Trimeren und Monomeren aus *Synechocystis* in Kombination mit Ferredoxin aus *Synechocystis*, *Spirulina platensis* oder *Chlamydomonas reinhardtii*. Alle vorgenannten Faktoren sind ohne Einfluß auf die no. 4-Phase. Nur unter zwei Bedingungen wurde sie nicht beobachtet: wenn die Probe bei pH 5.8 in Abwesenheit von Salzen gemessen wurde oder mit Ferredoxin aus *Spinat*. Eine tendenzielle Abnahme der sehr langsamen Kinetik mit geringerem pH oder bei Messungen in destilliertem Wasser wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls beobachtet. In zwei späteren Arbeiten der selben Arbeitsgruppe [75, 23] wird ebenfalls der Elektronenverlust von den terminalen Eisen-Schwefel-Zentren beobachtet, aber nicht diskutiert. Auf eine direkte Anfrage bei Pierre Sétif bei seinem Vortrag zur Ref. [23], gab er zur Antwort, daß nach wie vor nicht geklärt sei, wohin das Elektron transferiert wird. Zwei neuere Arbeiten an *Synechococcus* aus der Arbeitsgruppe um Golbeck [76, 77] berichten ebenfalls, daß eine sehr langsame Kinetik beobachtet wird, stellen aber nur die Vermutung an, daß das Elektron auf in der Lösung verbliebenen Restsauerstoff transferiert wurde.

Daß Sauerstoff der gesuchte Akzeptor X sein soll, ist nach den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen auszuschließen. Für diese Vermutung sprechen die Ergebnisse aus den Messungen, bei denen der Sauerstoff durch Argon verdrängt oder mit GOD entfernt wurde. Keine dieser Messungen zeigt eine vollständige Rekombination, wie sie zu beobachten sein müßte, wenn mit der Entfernung des Sauerstoffs der Akzeptor X entfernt worden wäre.

Da die Untersuchungen zur Rereduktion des  $P700^+$  aus dem Zustand  $P700^+F_AF_B$  (Abb. 4.10) gezeigt haben, daß es sich um eine Reaktion zweiter Ordnung handelt und die Messungen in destilliertem Wasser eine Verringerung der sehr langsamen Kinetik zeigen, ist es am wahrscheinlichsten, daß es sich bei dem Akzeptor X um eine externe Komponente handelt.

Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem Akzeptor um eine interne Komponente handelt. Die beobachtbare Rekombinationszeit für die sehr langsame Kinetik läßt sowohl einen externen Akzeptor zu, der um das Protein herumwandert und das Elektron wieder in das  $P700^+$  einspeist oder natürlich auch in das  $P700^+$  eines anderen PS I - Teilchen, als auch eine fest in das Protein eingebaute Redoxkomponente, mit der das  $P700^+$  direkt rekombinieren kann. Die Untersuchungen im Glaszustand lassen ebenfalls keine Aussage darüber zu, ob der konstante Anteil der PS I - Teilchen, die ihr Elektron verlieren, dadurch zustande kommt, daß kein Akzeptor an die anderen Eisen-Schwefel-Zentren

herandiffundieren kann oder daß aufgrund einer eingefrorenen Konformation der Elektronen-transfer zu einem internen Akzeptor bei dem mit 90 ms rekombinierenden Anteil permanent unterbrochen wird. Auch die Möglichkeit, den Akzeptor X um -250 mV vollständig reduzieren zu können, sagt nichts darüber aus, ob sich der Akzeptor intern oder extern befindet.

Um eine bessere Grundlage für eine Hypothese zu haben, wird zunächst der natürliche Weg der Oxidation der Eisen-Schwefel-Zentren betrachtet. Neben der PsaC-Untereinheit, spielen die Untereinheiten PsaD und PsaE eine wichtige Rolle bei der Reduktion des Ferredoxin durch das  $F_B^-$ . Während die Untereinheit PsaD die wichtigere Rolle bei der Bindung des Ferredoxin spielt, ist das PsaE überwiegend für die Reduktion des Ferredoxins und seine anschließende Dissoziation verantwortlich [78]. Von den einzelnen Aminosäuren der Proteine (Schema 4.2) haben das Arginin an der Position 39 im PsaE [79] und Lysin an der Position 35 im PsaC [80] eine essentielle Rolle beim Elektronentransfer vom terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum zu Ferredoxin. Beides also Aminosäuren, in deren Umgebung nach eventuellen Elektronenakzeptoren zu suchen ist, die das Elektron aufnehmen können, wenn kein Ferredoxin zugegen ist. Unter nativen Bedingungen, bei denen das Ferredoxin zugegen

PsaC	1	10	20	30	40	50	60
Syn:	MAHTVKIYDT	CIGCTQCVR	CPTDVLEMVP	WDGCKAGQIA	SSPRTEDCVG	CKRCETACPT	
Chla:	MAHIVKIYDT	CIGCTQCVR	CPLDVLEMVP	WDGCKASQMA	SAPRTEDCVG	CKRCETACPT	
Syn:		70	80				
Chla:		DFLSIRVYLG	AETTRSMGLA				
			Y				
			Y				
PsaD	1	10	20	30	40	50	60
Syn:	MAVMMRTQAP	AATRASSRVA	VAARPAARRA	VVVRAEAEAA	PAAAKKAAEK	PA	TTLTGQP
Chla:	MAVMMRTQAP	AATRASSRVA	VAARPAARRA	VVVRAEAEAA	PAAAKKAAEK	PA	TVPTLNP
Syn:		70	80	90	100	110	120
Chla:		DTPSPIFGGS	TGGLLSAADT	EEKYAITWTS	PKEQVFEMPT	AGAAVMREGE	NLVYFARKEQ
Syn:							
Chla:							
Syn:		130	140	150	160	170	180
Chla:		CLALAAQQLR	PRKINDYKIY	RIFPDGETVL	IHPKDGVPPE	KVNGGREAVN	SVPRSIGQNP
Syn:							
Chla:							
Syn:		190					
Chla:		NPSQLKFTGK	KPYDP				
			RMMSPAET				
PsaE	1	10	20	30	40	50	60
Syn:	MQALSSRVNI	AAKPQRAQRL	VVRAEEVKAA	PKKEVGPKRG	SKVKILRPES	YWFNEVGTV	YWFNEVGTV
Chla:	MQALSSRVNI	AAKPQRAQRL	VVRAEEVKAA	PKKEVGPKRG	SKVKILRPES	YWFNEVGTV	YWFNEVGTV
Syn:		70	80	90	100	110	
Chla:		SVDQTPGVKY	PVIVRFDKVN	YTGYSGSASG	VNTNPFALDE	VQEVAPPKKG	K
Syn:							
Chla:							

Schema 4.2 Proteinsequenzen aus *Synechococcus elongatus* (Syn) und

*Chlamydomonas reinhardtii* (Chla)

Cysteine, die die Eisen-Schwefel-Zentren komplexieren, sind orange eingezeichnet, redoxaktive Aminosäuren sind grau unterlegt

ist, wird ein Elektronentransfer auf das Ferredoxin mit drei Halbwertszeiten (500 ns, 20  $\mu$ s und 100  $\mu$ s [81]) beobachtet, der eine Rekombination mit ungefähr 825 ms [75] entgegensteht.

Ein interner Akzeptor, der auf die Eisen-Schwefel-Zentren folgt, könnte das Elektron sehr schnell aufnehmen und nur langsam mit  $P700^+$  rekombinieren.

Sollte bei der Oxidation der reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren tatsächlich ein interner Akzeptor eine Rolle spielen, ist dieser vermutlich auf der PsaE-Untereinheit zu suchen, da diese eine große Relevanz bei der Reduktion des Ferredoxin spielt [79] und somit eine redoxaktive Komponente im PsaE denkbar ist. Untersuchungen mit selektiver Substitution der Aminosäuren wären ein Ansatz, um einen internen Akzeptor mit letzter Sicherheit auszuschließen.

#### 4.2.2 Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Bei isoliertem PS I ist die Weiterleitung des Elektrons auf die Fd-NADP-Reduktase nicht möglich. Auch ein zyklischer Elektronentransfer ist aufgrund des nicht vorhandenen Ferredoxins ausgeschlossen. Ist jedoch Sauerstoff in der Meßlösung gelöst, kommt es nach der Ladungstrennung innerhalb des Proteins zu einer Reduktion des molekularen Sauerstoffs [82]. Über die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Sauerstoffkonzentration in der Lösung kann man Aussagen treffen, wie weit die Sauerstoffkonzentration in der Lösung verringert werden muß, damit die Reduktion von molekularem Sauerstoff praktisch nicht mehr stattfindet.

Als erster Schritt mußte die richtige Kombination aus einem Elektronendonator und einem Mediator gefunden werden, die das  $P700^+$  schneller reduziert, als es durch Rekombination rereduziert wird, aber zugleich den Sauerstoff in der Lösung nicht so schnell reduziert, daß eine Messung der blitzinduzierten Sauerstoffabnahme nicht mehr möglich ist. Bei Messungen mit Ascorbat oder DTE als Reduktionsmittel und MV, DCPIP, DAD, TMPD oder Hydrochinon in verschiedenen Konzentrationen als Mediator hat sich die Kombination von 5-10 mM Ascorbat mit 200  $\mu$ M TMPD oder 400  $\mu$ M DAD als sinnvoll erwiesen.

In der Abb. 4.11 sieht man den typischen Verlauf einer Messung mit Ascorbat als Reduktionsmittel und TMPD als Mediator. Aufgetragen wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration mit der Zeit unter Indizierung der einzelnen Arbeitsschritte. Anhand des Kurvenverlaufes läßt sich auch der Ablauf des Versuches beschreiben.

Von links nach rechts betrachtet, läßt sich erkennen, wie zunächst nur der Puffer in der Meßkammer vorliegt (schwarz). Lediglich das Verschließen der Küvette führt zu einem leichten Abfall der Sauerstoffkonzentration (rot), was auf den Sauerstoffverbrauch des Meßsensors

zurückzuführen ist. Die Zugabe der Probe (grün, 20  $\mu\text{M}$ ) und des Mediators TMPD (blau, 200  $\mu\text{M}$ ) zeigen keinen vermehrten Sauerstoffverbrauch. Erst mit der Zugabe des Ascorbats (hellblau, 5 mM) nimmt die Sauerstoffkonzentration erheblich schneller ab.

Auf der abfallenden Kurve wird dann mit Sequenzen von 20 Blitzen mit einer Wiederholungsfrequenz von 2 Hz der Sauerstoffverbrauch gemessen (violett). Abschließend wird mit einer Sequenz von 200 Blitzen und anschließender Messung mit 20 Blitzen überprüft, ob der Sauerstoffkonzentration gegen null gegangen ist (dunkelgrün). Das kleine Teilbild zeigt die Auswertung der Kurve durch das Anlegen der Ausgleichsgeraden vor und

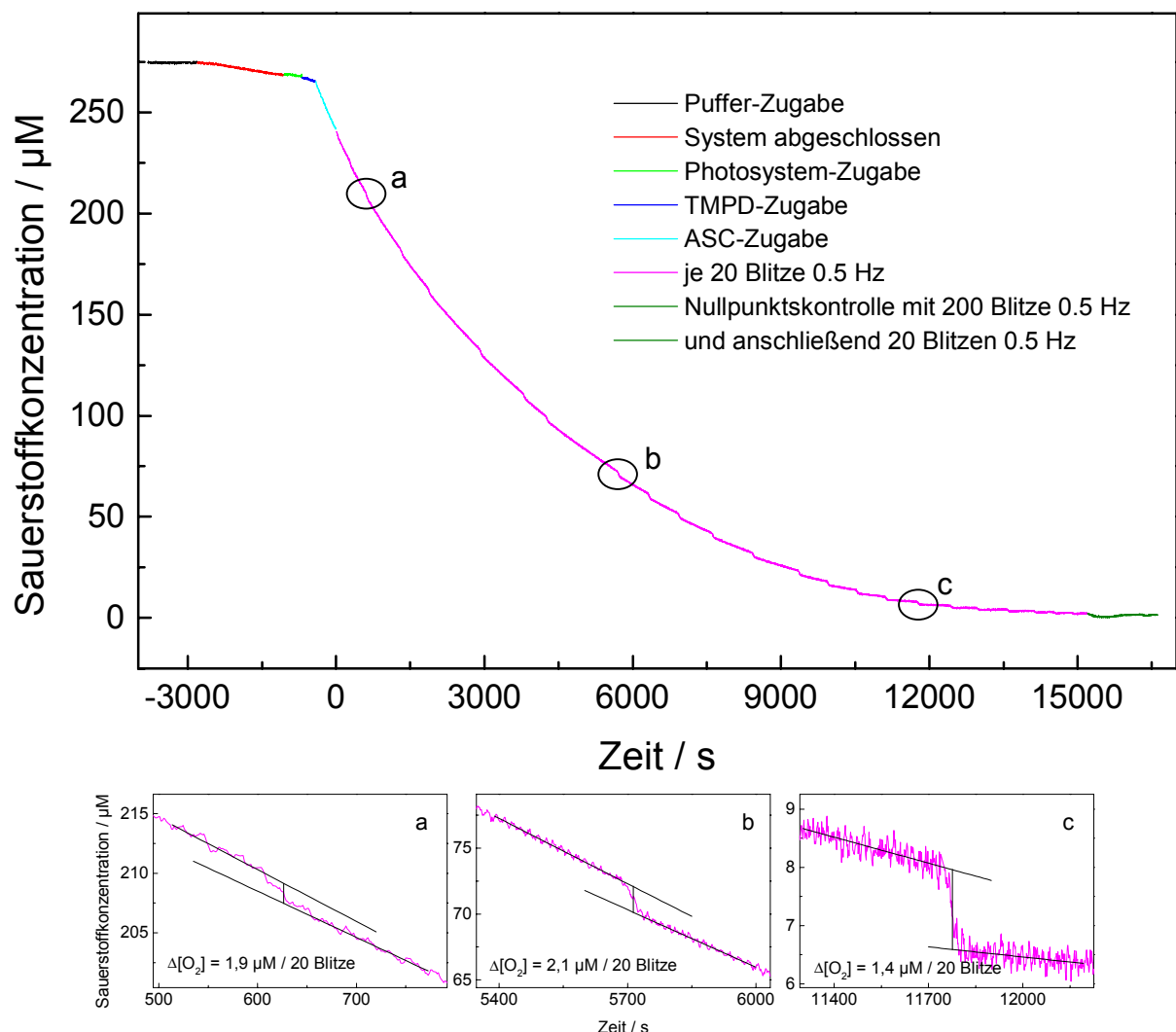


Abb. 4.11: Der Kurvenverlauf zeigt beispielhaft den Ablauf eines Versuches. Zunächst liegt nur der Puffer in der Meßkammer vor (schwarz), die dann verschlossen wird (rot). Anschließend wird die Probe (20  $\mu\text{M}$ , grün) das TMPD (200  $\mu\text{M}$ , blau) und Ascorbat (5 mM, hellblau) zugegeben. Auf der abfallenden Kurve wird dann mit Sequenzen von 20 Blitzen in 10 Sekunden der Sauerstoffverbrauch gemessen (violett). Abschließend wird der Nullpunkt mit einer Sequenz von 200 Blitzen und anschließender Messung mit 20 Blitzen überprüft (dunkelgrün). Die kleinen Teilbilder zeigen beispielhaft die grafische Auswertung der Meßkurve.

nach der Blitzsequenz und Bestimmung der Sauerstoffdifferenz durch das Einzeichnen einer Senkrechten, so daß die von ihr und der Meßkurve eingeschlossenen Flächen die gleiche Größe haben.

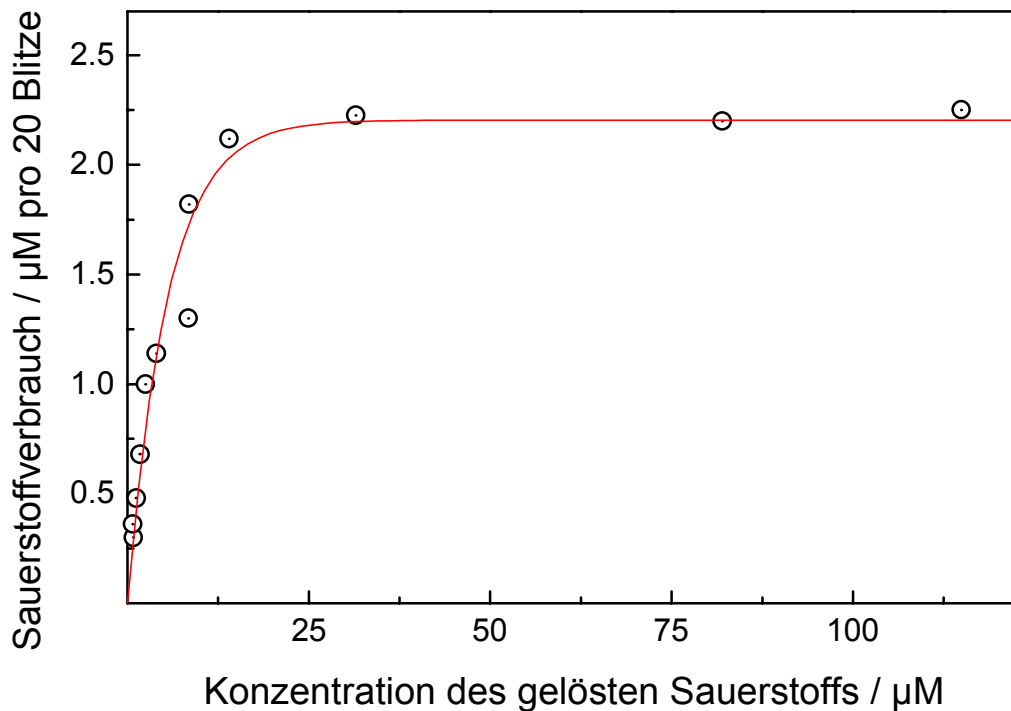


Abb. 4.12: Sauerstoffverbrauch durch blitzlichtangeregtes isoliertes PS I in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration  
 Die Meßpunkte zeigen die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Lösung für eine Blitzsequenz mit 20 Blitzen.  
 Meßbedingungen: 20  $\mu\text{M}$  Chl, 10 mM Asc, 400  $\mu\text{M}$  DAD  
 Aus der roten Kurve läßt sich eine Halbwertskonzentration von  $(3.3 \pm 0.2) \mu\text{M O}_2$  ermitteln.

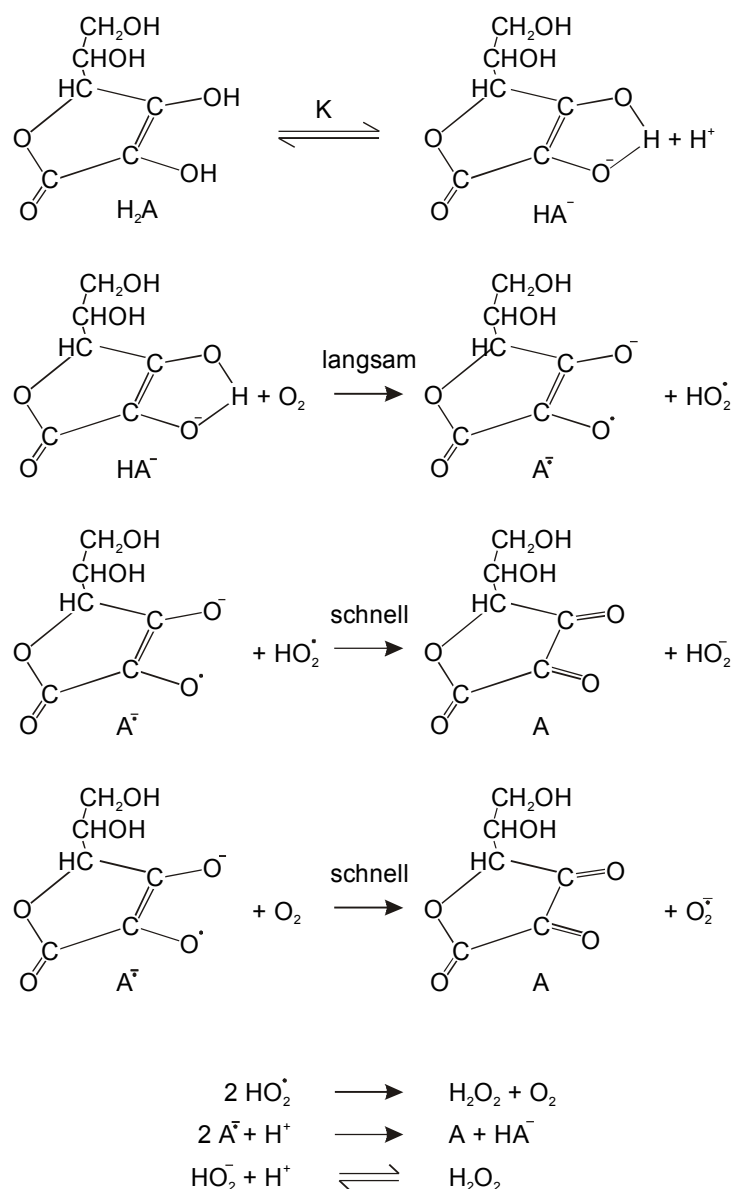
Abb. 4.12 zeigt die aus den Messungen resultierende Abhängigkeit des blitzinduzierten Sauerstoffverbrauchs von der gemittelten Sauerstoffkonzentration vor und nach der Blitzsequenz. Der Sauerstoffverbrauch ist über einen weiten Bereich konstant und beträgt 0.5  $\text{O}_2$  pro Reaktionszentrum und Blitz. Unterhalb einer Sauerstoffkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  nimmt der Sauerstoffverbrauch pro Blitz sukzessive ab. An den resultierenden Verlauf der Meßpunkte in Abb. 4.12 läßt sich eine Kurve für die Photoreduktion des  $\text{O}_2$  mit einer Halbwertskonzentration von  $(3.3 \pm 0.2) \mu\text{M O}_2$  anlegen. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem von Asada et al. [82] bei entsprechenden Messungen gefundenen Wert überein.

Da der direkte Elektronentransfer auf den Sauerstoff nur ca. 10 % ausmacht (siehe Kapitel 4.2.1.1), kann der Sauerstoffverbrauch nicht auf eine direkte Reduktion des Sauerstoffs durch

die reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren zurückzuführen sein. Aufgrund der vorliegenden Literatur wird folgende Arbeitshypothese zur Reduktion des Sauerstoffs aufgestellt:

Betrachtet man das Schema 4.3 der Autoxidation von Ascorbat, erkennt man, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt das Ascorbat-Ion ( $\text{HA}^-$ ) mit Sauerstoff zum Ascorbylradikal oxidiert wird. Dieses reagiert unter Elektronenabgabe an ein Sauerstoff oder  $\text{HO}_2^\bullet$  schnell zur Dehydroascorbinsäure weiter, so daß die Konzentration der Zwischenstufe nur sehr gering ist.

Das Elektron wird vom  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Dehydroascorbinsäure oder oxidiertes TMPD transferiert. Das entstehende Ascorbylradikal reagiert nun schnell unter



Schema 4.3: Reaktionsschema für die Autoxidation von Ascorbat in Wasser [83, 84]



Reduktion eines Sauerstoffmoleküls zurück zur Dehydroascorbinsäure. Das entstehende  $\text{HO}_2^\bullet$  dismutiert mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von  $8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [85] unter Entstehung von  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Damit sind bei einer Messung mit 200 nM Reaktionszentren die mit 2 Hz sättigend angeregt werden nach dem 20. Blitz 46.5 % der  $\text{HO}_2^\bullet$ -Radikale bereits zerfallen. Da der weitere Zerfall und der dadurch entstehende Anstieg der Sauerstoffkonzentration meßtechnisch nicht aufgelöst werden kann, erwartet man damit einen Sauerstoffverbrauch von ungefähr 0.75  $\text{O}_2$  pro Blitz. Ohne katalysierend wirkende Substanzen, wie beispielsweise  $\text{MnO}_2$ , ist die Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Bildung von  $\text{O}_2$  zu vernachlässigen. Vergleicht man diesen Wert mit dem gemessenen Wert von 0.5  $\text{O}_2$  pro Blitz würde dies bedeuten, daß ca. 70 % der PS I-Komplexe ihr Elektron zur Reduktion von Sauerstoff zur Verfügung stellen. Dies stimmt gut mit dem langsamen Amplitudenanteil in Abb. 4.1 überein.

Nimmt die Sauerstoffkonzentration zu sehr ab, reagiert das Ascorbylradikal mit  $\text{HO}_2^\bullet$  zu  $\text{HO}_2^-$  oder dismutiert zu Ascorbat und Dehydroascorbinsäure. Bei beiden Reaktionen, wird kein weiterer Sauerstoff reduziert.

Aus den vorhergehenden Messungen kann gezeigt werden, daß in maximal 15 % bis 25 % der PS I-Komplexe das Elektron direkt vom reduzierten Eisen-Schwefel-Zentrum auf den Sauerstoff transferiert wird. Der Vorschlag von Asada et al. [82], daß der Sauerstoff an dem PS I-Komplex direkt abgreift und sich ein  $K_M$ -Wert dafür berechnen läßt, ist nicht haltbar. Damit kann auch die von ihm angegebene Ratenkonstante nicht direkt der Sauerstoffreduktion zugeschrieben werden, sondern bestenfalls dem System aus Dehydroascorbinsäure, Ascorbylradikal und Sauerstoff. Bereits 1951, lange vor Asada et al., hat A.H. Mehler [86] zeigen können, daß die Verwendung von Ascorbat einen katalytischen Einfluß auf die Sauerstoffreduktion bei der Photosynthese hat.

#### 4.2.3 Änderung der Rekombinationskinetiken in Abhängigkeit des Redoxpotentials

Erniedrigt man das Redoxpotential vorsichtig durch weitere Dithionitzugabe, steigt unterhalb von -400 mV ein Anteil mit einer Halbwertszeit von ca. 10 ms während gleichzeitig der Anteil der 85 ms Phase abnimmt (Abb. 4.13 oben,  $t_{1/2}=80$  ms (56 %),  $t_{1/2}=12$  ms (34 %),  $t_{1/2}=250$   $\mu\text{s}$  (10 %)). Bei einer weiteren Erniedrigung des Redoxpotentials auf den kleinsten bei pH 10 erreichbaren Wert (um -590 mV) überwiegt eine Komponente mit ungefähr 300  $\mu\text{s}$  (Abb. 4.13 unten,  $t_{1/2}=300$   $\mu\text{s}$  (90 %),  $t_{1/2}=8$  ms (10 %)).

Umfangreiche Meßreihen haben gezeigt, daß alle Transienten, die für eine vollständige Rekombination beobachtet wurden, mit unterschiedlichen Anteilen dreier Kinetiken beschrie-

ben werden können. Die Halbwertszeiten dieser drei Kinetiken betragen 80 ms - 85 ms, 8 ms - 12 ms und 250  $\mu$ s - 300  $\mu$ s. Diese Kinetiken gelten über den in unseren Meßreihen verwendeten Bereich des Redoxpotentials (+150 mV - -590 mV) und pH-Werten (4.0 - 10.0) und werden den unterschiedlichen Oxidationsstufen der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren vor der Blitzlichtanregung zugeordnet (siehe Kapitel 4.2.3.2).

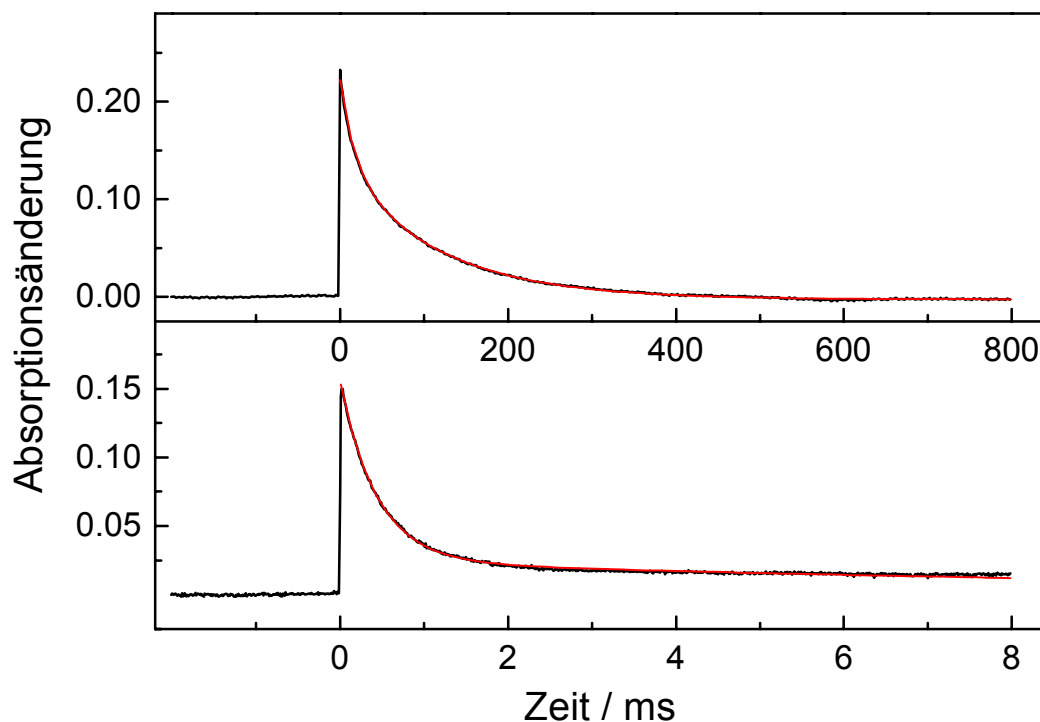


Abb. 4.13: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*

Meßbedingungen:

oben: schwarze Linie: 33  $\mu$ M Chl a, pH=6.5, anaerobe Bedingungen, mit Dithionit eingestelltes Redoxpotential auf ca. -400 mV; rote Linie: triexponentielle Anpassung mit  $t_{1/2}$ =80 ms (56 %),  $t_{1/2}$ =12 ms (34 %),  $t_{1/2}$ =250  $\mu$ s (10 %)

unten: schwarze Linie: 20  $\mu$ M Chl a, pH=10.0, anaerobe Bedingungen mit Dithionit eingestelltes Redoxpotential auf ca. -590 mV; rote Linie: biexponentielle Anpassung mit  $t_{1/2}$ =300  $\mu$ s (90 %),  $t_{1/2}$ =8 ms (10 %)

Für die bi- und triexponentiellen Anpassungen wurde weitere Messungen in den entsprechenden Zeitfenstern hinzugezogen.

#### 4.2.3.1 Absorptionsdifferenzspektrum für die Rekombination von $P700^+$ mit $(F_A F_B)^-$

Mit Hilfe von Absorptionsdifferenzspektren soll entschieden werden, ob die beobachtete 10 ms und 80 ms Kinetik den Rekombinationsreaktionen der reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren mit dem  $P700^+$  zugeordnet werden können. Hierzu wird sowohl ein Absorptionsdifferenzspektrum unter schwach reduzierenden Bedingungen aufgenommen, als auch eines

nach der in der Literatur beschriebenen Methode unter Verwendung von einem Akzeptor und einem Donator [33]. Akzeptor und Donator werden so gewählt, daß die Rereduktion vom  $P700^+$  mit einer eindeutig unterschiedlichen Kinetik zur Reoxidation der reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren erfolgt. Dies erlaubt, die Differenzspektren für  $(FeS^{\cdot-}/FeS)$  und  $(P700^+/P700)$  separat aus den aufgezeichneten Transienten herzuleiten (siehe Abb. 4.14).

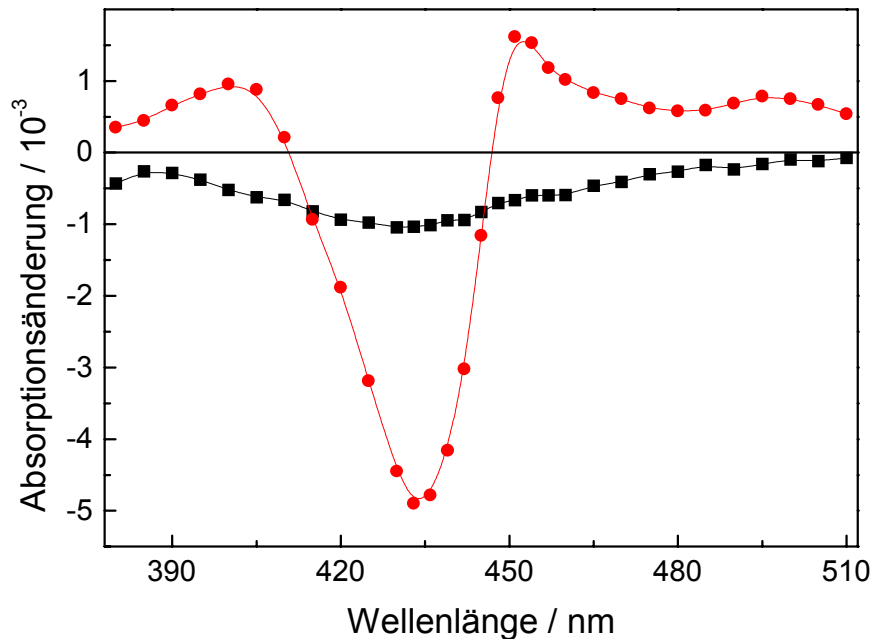


Abb. 4.14: Amplitudenanteile der blitzinduzierten Absorptionsänderung von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
 Meßbedingungen:  
 DPIP:  $300\mu M$ , Ascorbat:  $5\text{ mM}$ , MV:  $50\mu M$ ,  $pH = 7.5$   
 schwarze Quadrate: schnelle Reoxidationsphase der reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren  
 rote Kreise: langsame Rereduktionsphase des  $P700^+$

In unserem Fall wurde eine Kombination aus  $8\mu M$  PMS und  $5\text{ mM}$  Ascorbat als Donator und  $50\mu M$  MV, das wiederum durch Luftsauerstoff oxidiert wird, als Akzeptor verwendet. Unter diesen Bedingungen beträgt die Halbwertszeit für die Rereduktion von  $P700^+$  ungefähr  $20\text{ ms}$  und für die Reoxidation der reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren ungefähr  $650\mu s$ . Die Summe der Anfangsamplituden der beiden Transienten ist in Abb. 4.15 mit ausgefüllten Quadraten dargestellt. Die Spektren werden im Wellenlängenbereich zwischen  $380\text{ nm}$  und  $750\text{ nm}$  gemessen.

Für die Transienten unter vorreduzierten Bedingungen wurde die Probe unter anaeroben Bedingungen bei  $pH\ 6.5$  mit  $1.5\text{ mM}$  Dithionit reduziert. Unter diesen Bedingungen gehen wir davon aus, daß keine Elektronen für die Rekombination verloren gehen. Die Summe der

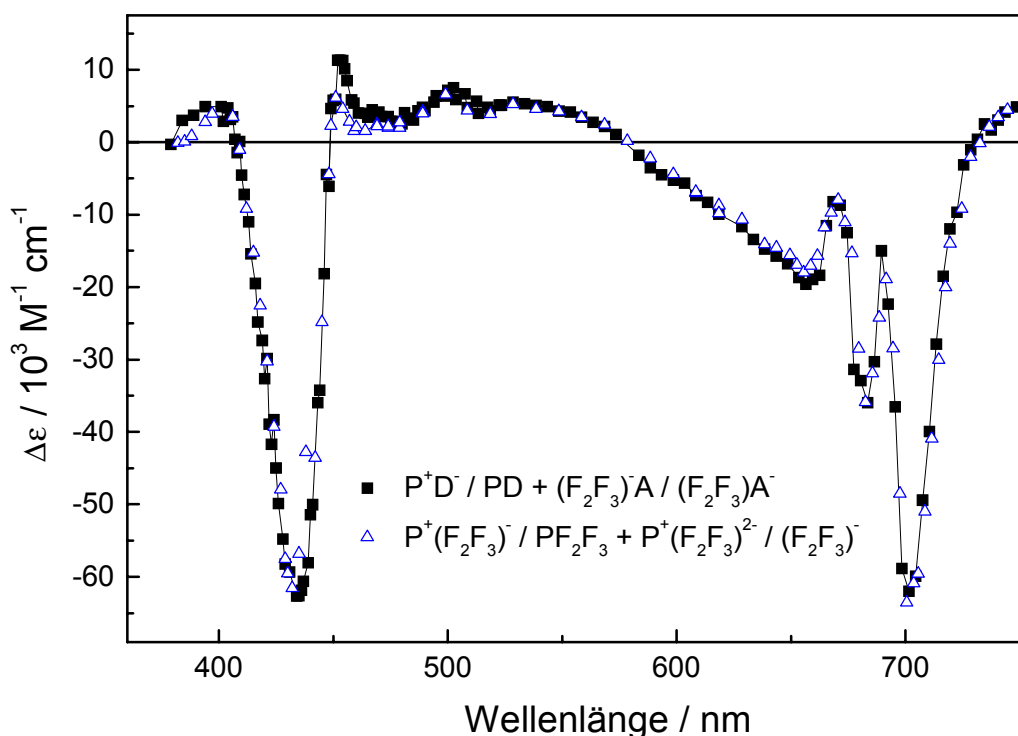


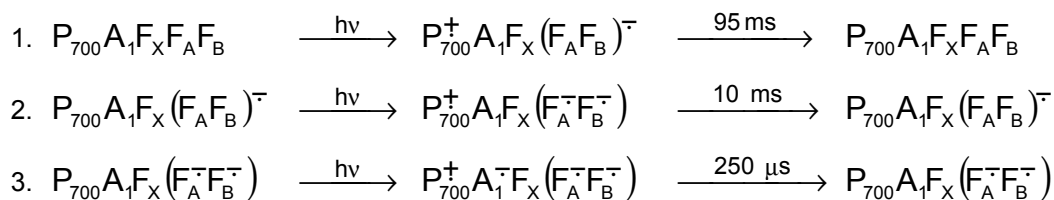
Abb. 4.15: Vergleichende Darstellung der Absorptionsdifferenzspektren:  
 (■) Summe der 650  $\mu$ s und 20 ms Kinetiken (8  $\mu$ M PMS, 50  $\mu$ M MV und 5  $\mu$ M Chl);  
 (Δ) Summe der 10 ms und 80 ms Kinetiken (vorreduziert bei pH 6.5)

Amplitudenanteile für die 10 ms und 80 ms Kinetik ist in Abb. 4.15 mit offenen Dreiecken dargestellt. Da die Rekombination zwischen  $P700^+$  und den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren stattfindet, ist eine Separierung des Absorptionsdifferenzspektrums in die Einzelspektren für  $P700/P700^+$  und  $FeS/FeS^-$  nicht möglich.

Man erkennt, daß die Summe der Absorptionsänderung für die Oxidation von  $P700^+$  und die Reduktion von  $(F_A F_B)^-$  gut mit der Summe der Absorptionsänderung für die Rekombination von  $P700^+$  mit  $(F_A F_B)^-$  und von  $P700^+$  mit  $(F_A^- F_B^-)$  übereinstimmt. Geringe Abweichungen sind nur im Bereich um 450 nm zu erkennen.

Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Bei der vorreduzierten Probe liegen ca. 50 % der Eisen-Schwefel-Zentren bereits einfach reduziert vor (siehe auch Kapitel 5), so daß das Differenzspektrum auch von dem Redoxpaar  $(F_A F_B)^-/(F_A^- F_B^-)$  gebildet wird. Da es keine Erkenntnisse über dieses Differenzspektrum gibt, wäre es denkbar, daß es von dem des Überganges  $(F_A F_B)/(F_A F_B)^-$  abweicht. Wäre der Differenzextinktionskoeffizient von  $(F_A F_B)^-/(F_A^- F_B^-)$  um 450 nm negativer als beim  $(F_A F_B)/(F_A F_B)^-$  hätte dies eine weniger positive Gesamtamplitude zur Folge.

#### 4.2.3.2 Zuordnung der gefundenen Rekombinationskinetiken und Diskussion



*Schema 4.4: Zuordnung der gefundenen Rekombinationskinetiken zu den Redoxzuständen des PS I vor dem Blitz*

Schema 4.4 zeigt die Zuordnung der gefundenen Halbwertszeiten zu den möglichen Rekombinationsreaktionen. Aufgrund der Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Messungen unter leicht reduzierenden Bedingungen und den Messungen unter Anwesenheit von Luft-sauerstoff wird die 95 ms Kinetik der Ladungsrekombination von  $\text{P700}^+$  mit  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  zugeordnet. Das heißt, diese Kinetik wird beobachtet, wenn vor dem Blitz der Zustand  $\text{P700}(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})$  vorliegt. Der 10 ms Kinetik wird die Rekombination von  $\text{P700}^+$  mit  $(\text{F}_\text{A}^-\text{F}_\text{B}^-)$  zugeordnet, da keine weiteren Zwischenzustände beobachtet werden konnten. Eine eindeutige Zuweisung, an welchem Eisen-Schwefel-Zentrum sich das Elektron befindet, kann nicht gemacht werden, da die Differenz zwischen den beiden Halbstufenpotentialen von  $\text{F}_\text{A}/\text{F}_\text{A}^-$  und  $\text{F}_\text{B}/\text{F}_\text{B}^-$  zu gering ist (siehe Kapitel 5) und sich ein schnelles Gleichgewicht einstellen wird. Eine Inhomogenität der Signale, die auf eine unterschiedliche Besetzung der Elektronen auf die beiden Zentren in verschiedenen Proteinen hindeuten würde, wurde nicht beobachtet. Die 250  $\mu\text{s}$  bis 300  $\mu\text{s}$  Kinetik wird der Rekombination von  $\text{P700}^+$  mit  $\text{A}_1^-\text{F}_\text{X}(\text{F}_\text{A}^-\text{F}_\text{B}^-)$  zugeordnet. Dieser Wert ist bereits aus der Literatur bekannt [87].

In der Arbeit von Vassiliev et al. [24] werden bei Untersuchungen der Rekombinationsreaktionen im Photosystem I ebenfalls die Halbwertszeiten von 10 ms und 80 ms gefunden. Die Messungen wurden nicht unter reduzierenden Bedingungen ausgeführt. Zusätzlich wurde den Proben DCIP und Ascorbat zugesetzt. Für Messungen ohne Elektronendonator weichen die Halbwertszeiten von den zuvor in der Arbeit von Vassiliev et al. angegebenen stark ab. Zusätzlich ist die Anfangsamplitude ohne Donatoren 60 % geringer als mit Elektronendonatoren, was die Vermutung nahe legt, daß eventuelle inhomogene Anteile der Probe mit einer sehr großen Halbwertszeit der Relaxation von der Messung gar nicht mehr erfaßt wurden, da das  $\text{P700}$  in ihnen bereits vor der Messung oxidiert vorlag. Dies könnte auch erklären, warum das Phänomen der häufiger beobachteten sehr langsamen Kinetik hier nicht gefunden wurde. Bei den Messungen mit Elektronendonator dürfte die 1.9 s Kinetik von der Rereduktion des

P700<sup>+</sup> mit DCIP herrühren, bei der Messung ohne Elektronendonatoren wurde die sehr langsame Kinetik nicht beobachtet, da P700 zum Teil bereits vor der Messung oxidiert vorliegt.

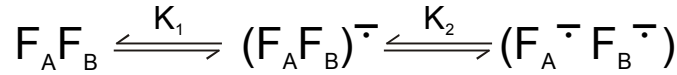
Für die Messung mit Elektronendonator wurde der Amplitudenanteil der 80 ms Kinetik mit 40 % angegeben, der der 10 ms Kinetik mit 10 %. Darüber hinaus wurden Rekombinationsreaktionen mit Halbwertszeiten von 26  $\mu$ s, 149  $\mu$ s, 1.3 ms, 188 ms und 1.0 s gefunden. Die Zuweisung der 10 ms und 80 ms Kinetik erfolgt in der Arbeit auch unspezifisch der Rekombination vom P700<sup>+</sup> mit (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup>. Das Auftreten beider Kinetiken für einen Ausgangszustand wird in der möglichen Existenz zweier Konformere des Proteins vermutet.

Da aus den veröffentlichten Abbildungen nur ein Amplitudenanteil von 5 % für die 10 ms Kinetik ersichtlich ist, wird vermutet, daß sich durch Restlicht bei den Messungen ein Gleichgewicht zwischen Elektronenvorwärtstransfer und Elektronenabgabe an die mit DCIP und Ascorbat versetzte Pufferlösung eingestellt hat, bei der 5 % der Probe bereits als (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>)<sup>-</sup> vorlag und dadurch der Anteil der 10 ms Kinetik zu beobachten war.

## 5 Halbstufenpotentiale der einfach und doppelt reduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren $(F_A F_B)^{\cdot -}$ und $(F_A^{\cdot -} F_B^{\cdot -})$

### 5.1 Einführung

Unter der Voraussetzung, daß die Anteile der Amplituden der unterschiedlichen Kinetiken die Konzentrationen der Reduktionszustände der Eisen-Schwefel-Zentren vor dem Blitz wiedergeben und daß sich das Gleichgewicht



schnell einstellt, kann die Abhängigkeit der Amplitudenanteile vom Redoxpotential mit modifizierten Nernstfunktionen beschrieben werden.

Für das Verhältnis von  $c(F_A F_B)$  zu  $c_\Sigma$  ( $c_\Sigma = c(F_A F_B) + c(F_A F_B)^{\cdot -} + c(F_A^{\cdot -} F_B^{\cdot -})$ ) gilt:

$$\frac{c(F_A F_B)}{c_\Sigma} = \frac{1}{1 + K_1 + K_1 \cdot K_2}$$

Hieraus ergibt sich mit  $K_i = \frac{c(\text{red}_i)}{c(\text{ox}_i)} = e^{-\frac{(E-E_{m,i})}{RT} \frac{zF}{RT}}$ :

$$\text{I} \quad \frac{c(F_A F_B)}{c_\Sigma} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1})} + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1}+E-E_{m,2})}} \quad \text{Gl. 5.1}$$

mit  $E_{m,1} = E_m((F_A F_B)/(F_A F_B)^{\cdot -})$  und  $E_{m,2} = E_m((F_A F_B)^{\cdot -}/(F_A^{\cdot -} F_B^{\cdot -}))$ .

Entsprechend gilt für die anderen Redoxzustände:

$$\text{II} \quad \frac{c(F_A F_B)^{\cdot -}}{c_\Sigma} = \frac{e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1})}}{1 + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1})} + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1}+E-E_{m,2})}} \quad \text{Gl. 5.2}$$

$$\text{III} \quad \frac{c(F_A^{\cdot -} F_B^{\cdot -})}{c_\Sigma} = \frac{e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1}+E-E_{m,2})}}{1 + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1})} + e^{\frac{-zF}{RT}(E-E_{m,1}+E-E_{m,2})}} \quad \text{Gl. 5.3}$$

Die so resultierenden Potentiale  $E_{m,1}$  und  $E_{m,2}$  geben dann die Halbstufenpotentiale für die einfach und doppelt reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren an.

In der Literatur wurde  $E_{m,2}$  meist dem Redoxpaar  $F_B/F_B^{\cdot -}$  zugewiesen, was aber in anbetracht des ähnlichen Halbstufenpotentials und der geringen räumlichen Distanz von  $F_A/F_A^{\cdot -}$  nicht

möglich ist. Eine Abschätzung, daß das Halbstufenpotential von  $F_B/F_B^-$  lediglich weniger als 10 mV unter dem von  $F_A/F_A^-$  liegt, und somit eine Zuweisung des  $E_{m,2}$  zum Redoxpaar  $F_B/F_B^-$  in der Literatur falsch ist, erfolgte bereits in der Doktorarbeit von A. Kamlowski [88, Kap. 5.2.2] mit Hilfe von EPR-Messungen am Einkristall aus *Synechococcus elongatus*.

Im folgenden soll die Abhängigkeit der Anteile der unterschiedlichen Rekombinationsreaktionen (siehe Schema 4.4) am zeitlichen Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* als Funktion des Redoxpotentials bestimmt werden. Trägt man die Amplituden als Funktion des Redoxpotentials auf, kann dann durch Anpassung der modifizierten Nernst-Funktionen das Halbstufenpotential für  $(F_A F_B)/(F_A F_B)^-$  und  $(F_A F_B)^-/(F_A^- F_B^-)$  bestimmt werden. Ferner werden EPR-Signale in dem Potentialbereich aufgezeichnet, in dem auch die optischen Messungen durchgeführt werden, um einen direkten Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Äquilibrierungszeiten

Um einen Anhaltspunkt darüber zu bekommen, wieviel Zeit für die Äquilibrierung des Redoxsystems nach Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit benötigt wird, wurde bei den pH-Werten 4.0, 5.0, 5.5, 7.5, 9.0 und 10.0 die Entwicklung der Transienten in drei Zeitfenstern (1000 ms, 100 ms und 10 ms) als Funktion der Zeit gemessen. Abb. 5.1 zeigt die Änderung

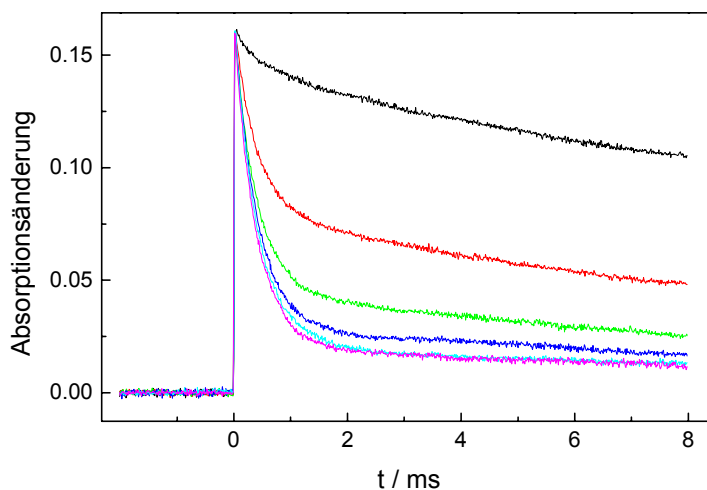


Abb. 5.1: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*

Meßbedingungen:

pH=9.0 und 1.5 mM Dithionit

Die Transienten sind von oben nach unten 1 min, 8 min, 15 min, 27 min, 41 min und 53 min nach der Dithionitzugabe aufgenommen worden.



der Transienten mit der Zeit für eine Probe bei pH = 9.0.

Für die verschiedenen pH-Werte ergeben sich die Äquilibrierungszeiten wie folgt: pH 4.0 und pH 5.0 unter 5 min, pH 5.5 ca. 5 min, pH 7.5 ca. 25 min und pH 9.0 ca. 40 min. Bei pH 10.0 liegt die Zeit grob geschätzt bei 55 min. Eine verlässliche Angabe ist hier nicht möglich, da es in Ausnahmefällen dazu gekommen ist, daß die Probe bereits wieder oxidiert wurde, bevor sich ein stabiler Zustand eingestellt hat. Daher muß bei pH-Werten > 9.0 bei jeder Messung individuell geprüft werden, ob das Signal über einen Zeitraum von ca. 5 min konstant ist, um von einer Äquilibrierung ausgehen zu können.

Um der langsamen Potentialeinstellung bei  $\text{pH} \geq 10.0$  entgegenzuwirken, wurden Testmessungen mit  $0.5 \mu\text{M}$  PMS durchgeführt. Dies führt zu einer 2 bis 3 mal schnelleren Äquilibrierung. Um die gemessenen Rekombinationszeiten durch Einspeisung in das  $\text{P700}^+$  nicht zu verfälschen, wurde aber auf die Zugabe des Mediators verzichtet und bei jeder Messung die Konstanz des Transienten mit der Zeit geprüft.

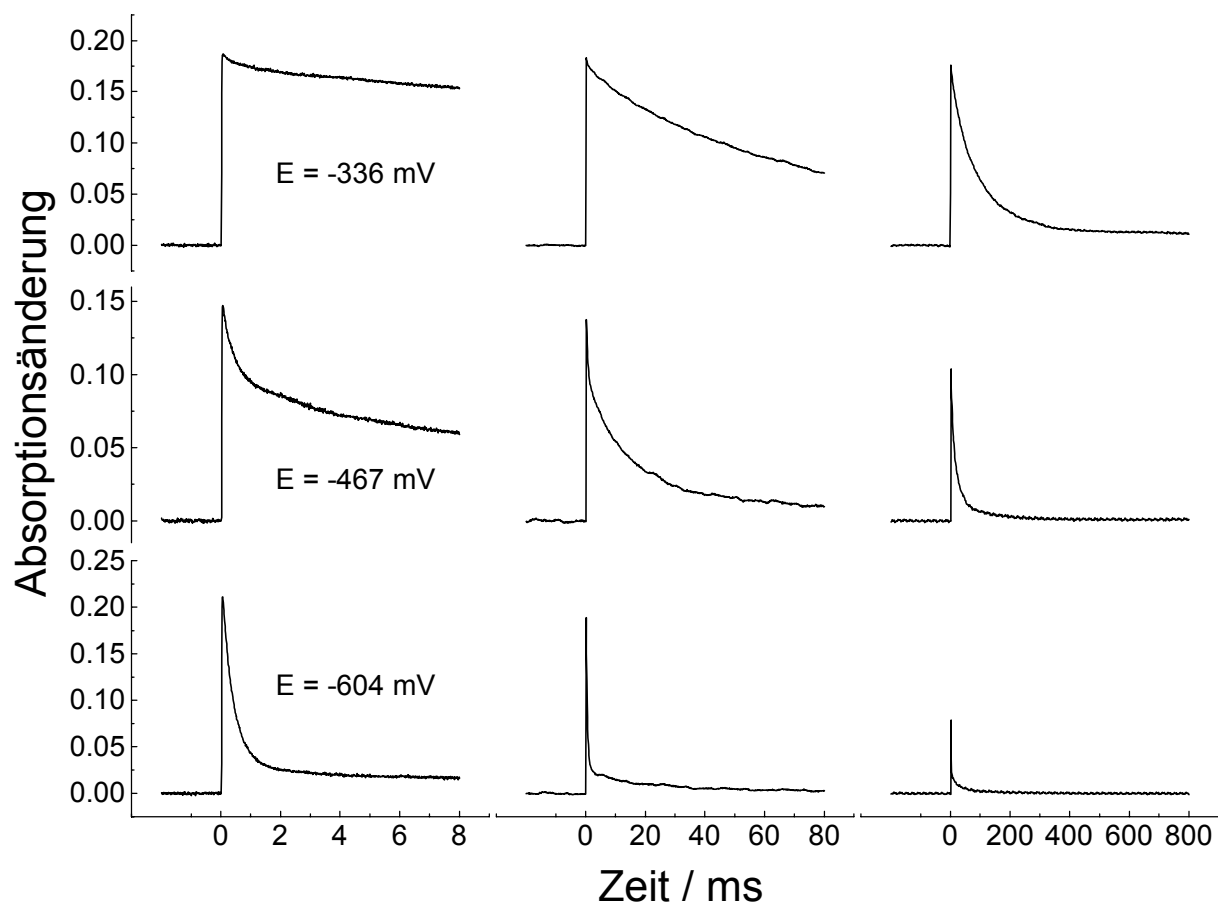


Abb. 5.2: Ausgewählte zeitliche Verläufe der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* bei drei verschiedenen Redoxpotentialen

Meßbedingungen:

Die Einstellung des Redoxpotentials erfolgte wie unter Kapitel 3.4 beschrieben; die Chl *a* Konzentration betrug ca.  $18 \mu\text{M}$ ; die Transienten wurden im Einzelblitz aufgezeichnet.

### 5.2.2 Redox titrationen von *Synechococcus elongatus*

Abb. 5.3 zeigt die Amplitudenanteile der unterschiedlichen Rekombinationsreaktionen an den beobachteten Transienten als Funktion des Potentials (siehe Abb. 5.2 für drei ausgewählte Potentiale). Ausgehend davon, daß die Amplitudenanteile der drei Kinetiken proportional zu den Konzentrationen der drei Redoxzustände vor dem Blitz,  $P700A_1F_XF_AF_B$  (■),  $P700A_1F_X(F_AF_B)^{\cdot-}$  (○),  $P700A_1F_X(F_A^{\cdot-}F_B^{\cdot-})$  (▲), sind, können an die Meßpunkte die in Kapitel 5.1 hergeleiteten modifizierten Nernstfunktionen angepaßt werden (siehe durchgezogene Linien in Abb. 5.3). Die daraus resultierenden Halbstufenpotentiale betragen  $(-440 \pm 10)$  mV für die erste Reduktionsstufe und  $(-465 \pm 10)$  mV für die zweite Reduktionsstufe der beiden terminalen Eisen-Schwefel-Zentren im Photosystem I.

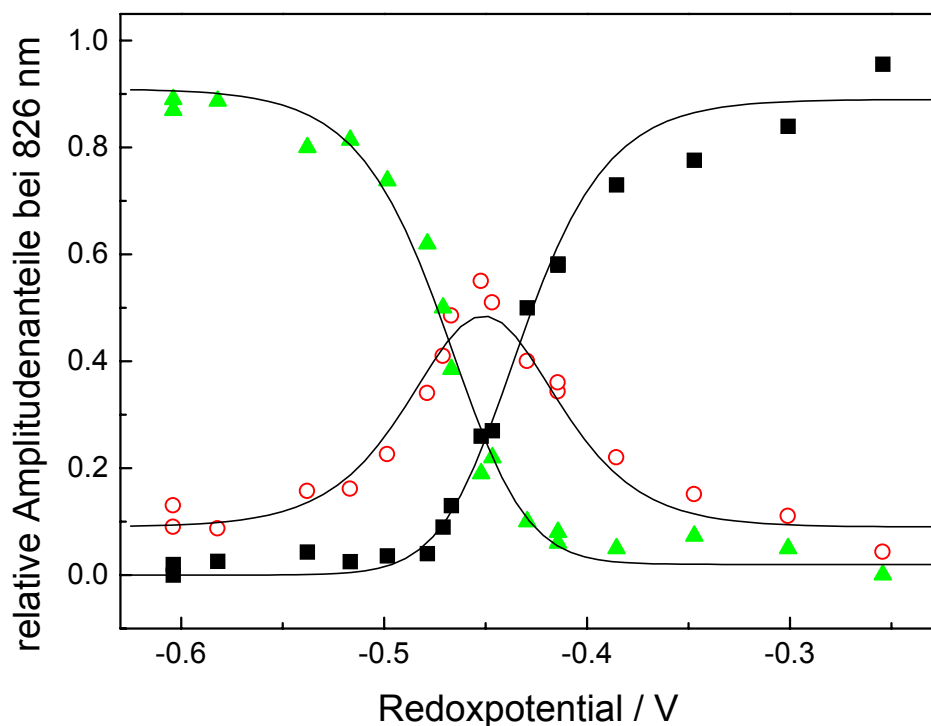


Abb. 5.3: Redox titration von *Synechococcus elongatus*

Aufgetragen sind Amplitudenanteile der unterschiedlichen Rekombinationsreaktionen an den gemessenen Transienten als Funktion des Redoxpotentials

▲ Anteil der 250  $\mu$ s Kinetik ( $P700A_1F_X(F_A^{\cdot-}F_B^{\cdot-})$ ), ○ Anteil der 10 ms Kinetik ( $P700A_1F_X(F_AF_B)^{\cdot-}$ ), ■ Anteil der 85 ms Kinetik ( $P700A_1F_XF_AF_B$ )

Entsprechende Messungen wie für *Synechococcus elongatus* wurden auch für *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt. Hier können die Meßwerte im positiven Bereich nicht verwendet werden, da die Proben bei kleinen pH-Werten wesentlich instabiler waren als bei *Synechococcus elongatus*. Dadurch steigt der Fehler der Auswertung. Tendenziell sind die

Ergebnisse, mit  $(-420 \pm 20)$  mV für die erste Reduktion und  $(-440 \pm 20)$  mV für die zweite Reduktion, etwas positiver als bei *Synechococcus elongatus*.

#### 5.2.2.1 Überprüfung der Redoxtitrationen mit Hilfe der EPR

Wie aus Tabelle 1.1 ersichtlich, sind fast alle in der Literatur beschriebenen Halbstufenpotentiale für die Eisen-Schwefel-Zentren  $F_A^-$  und  $F_B^-$  mit Hilfe der EPR bestimmt worden. Um einen besseren Vergleich der Ergebnisse in dieser Arbeit zu diesen Messungen zu erhalten, wurden ebenfalls EPR-Messungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Messungen wurde das Potential dabei nicht unter Zugabe von Mediatoren und direkter Messung der Spannung eingestellt, sondern entsprechend den optischen Messungen bei Raumtemperatur vorgegangen (siehe Kapitel 4).

	g-Tensorhauptwerte des FeS-Zentrums			Spezies	Ref.
	$g_{xx}$	$g_{yy}$	$g_{zz}$		
$F_A^-$	1.856	1.941	2.051	<i>Synechococcus elongatus</i>	[88]
	1.865	1.942	2.050	<i>Synechocystis 6803</i>	[89]
	1.87	1.95	2.05	<i>Spinat</i>	[90]
	1.86	1.94	2.05	<i>Spinat</i>	[91]
	1.866	1.948	2.054	<i>Synechococcus elongatus</i>	[92]
$F_B^-$	1.880	1.916	2.056	<i>Synechococcus elongatus</i>	[88]
	1.886	1.920	2.067	<i>Synechocystis 6803</i>	[89]
	1.88	1.93	2.07	<i>Spinat</i>	[90]

Tabelle 5.1: g-Hauptwerte von  $F_A^-$  und  $F_B^-$

	g-Faktoren des gekoppelten Systems				Spezies	Ref.
$(F_A^- F_B^-)$					<i>Spinat</i>	[34]
					<i>P. laminosum</i>	[93]
					<i>Spinat</i>	[103]
					<i>Synechococcus elongatus</i>	[94]
	2.051	1.944	1.922	1.891	<i>Spinat</i>	[89]
	2.050	1.941	1.916	1.885	<i>Synechocystis 6803</i>	[89]

Tabelle 5.2: g-Faktoren des gekoppelten Systems  $(F_A^- F_B^-)$

Abb. 5.4 zeigt das Verhalten der EPR-Signale in der Region um  $g = 2$  in Abhängigkeit vom Potential. Anders als bei den in der Literatur gemessenen Spektren tritt hier kein dominierendes Signal bei  $g = 2.00$  auf, da keine reduzierten Mediatoren vorliegen. Kleine Signale bei  $g = 2.00$  können von fast jedem organischen Radikal herrühren, aber auch von unbeabsichtigt durch Restlicht oxidiertem P700<sup>+</sup>.

Unter Zuhilfenahme der aus der Literatur bekannten Werte (siehe Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2) wurden die gemessenen Signale zugeordnet. Die  $g$ -Tensorhauptwerte für Zentren, in denen nur  $F_A^-$  oder  $F_B^-$  reduziert vorliegen, betragen für  $F_A^-$   $g_{xx} = 1.865$ ,  $g_{yy} = 1.942$  und  $g_{zz} = 2.05$  und sind in den Abbildungen grün eingezeichnet; die blau eingezeichneten Werte für  $F_B^-$  betragen  $g_{xx} = 1.880$ ,  $g_{yy} = 1.927$  und  $g_{zz} = 2.064$ . Liegen beide Eisen-Schwefel-Zentren in einem Protein gleichzeitig reduziert vor, resultiert aufgrund der Spin-Spin-Kopplung der FeS-Zentren bei tiefen Temperaturen ein gemeinsames Spektrum mit den  $g$ -Faktoren  $g = 2.05$ ,  $1.942$ ,  $1.927$  und  $1.89$ . Diese sind durch rote senkrechte Linien gekennzeichnet. Die Werte stimmen mit einer Ausnahme alle mit den Literaturwerten überein. Der Wert mit  $g = 1.927$  für das gekoppelte Spektrum weicht von den Literaturwerten ab. Eine Anpassung mit einem kleineren  $g$ -Faktor erscheint aber aufgrund des Spektrums nicht richtig.

Bei  $-405$  mV sind bereits schwache Signale aufgrund einer partiellen Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren zu erkennen. Bei  $-450$  mV sieht man sowohl Signale bei  $g = 1.865$  als auch bei  $g = 2.064$ , was darauf hindeutet, daß sowohl Proteine in denen nur  $F_A^-$  vorliegt als auch Proteine in denen nur  $F_B^-$  vorliegt, vorhanden sind. Mit fallendem Potential erkennt man eindeutig den Anstieg des Signals bei  $g = 1.89$  auf Kosten des Signals bei  $g = 1.865$ . Da es aber noch zu keinem eindeutigen Anstieg des Signals bei  $g = 1.927$  gekommen ist und das Signal bei  $g = 2.064$  eher intensiver als schwächer geworden ist, scheint dies weniger dadurch bedingt, daß die Eisen-Schwefel-Zentren bereits doppelt reduziert sind, als daß in dieser Probe ein höherer Anteil an  $F_B^-$  vorliegt. Mit  $-505$  mV ist ein Potential erreicht, bei dem das Signal bei  $g = 1.927$  vollständig ausgeprägt ist. Zudem ist das Signal bei  $g = 1.864$  vollständig und das bei  $g = 2.064$  fast vollständig verschwunden, was darauf hindeutet, daß nur noch doppelt reduziertes PS I vorliegt. Dies wird dadurch bestätigt, daß es bei einer weiteren Erniedrigung des Potentials auf ca.  $-560$  mV zu keiner weiteren Veränderung des Signals kommt.

Um die Abhängigkeit der Spektren von der Temperatur zu untersuchen, wurden bei verschiedenen Redoxpotentialen Messungen bei zwei bis drei Temperaturen zwischen  $8$  K und  $20$  K durchgeführt.

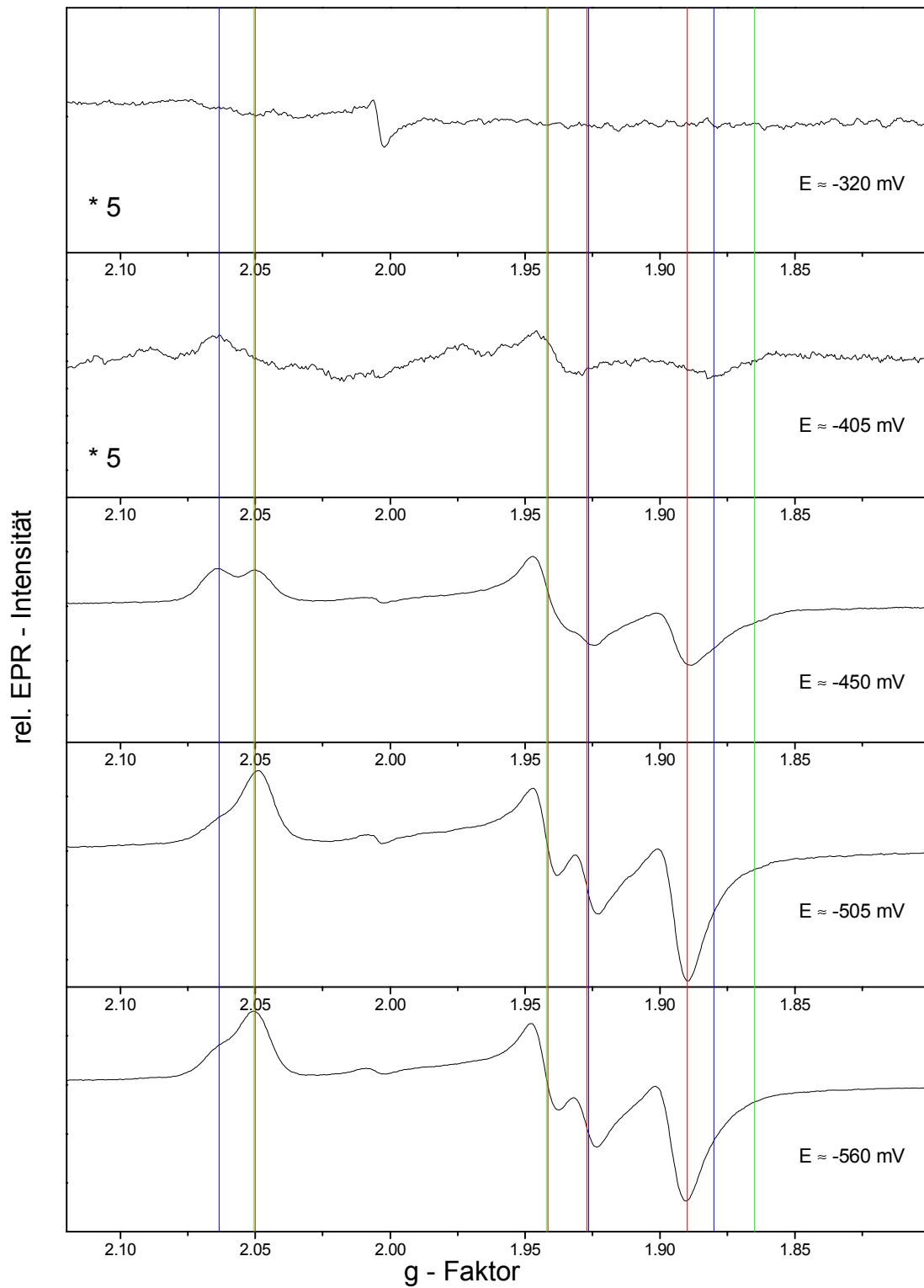


Abb. 5.4: EPR-Signale der Eisen-Schwefel-Zentren aus trimerem PS I aus *Synechococcus elongatus* bei unterschiedlichen Redoxpotentialen.

Die y-Achse bei -320 mV und -405 mV ist um Faktor 5 gedehnt.

Parameter: 9.440 GHz, 10 mW Mikrowellenleistung, 5 G Modulationsamplitude bei 100 kHz, Temperatur 10 K

grün:  $g_{xx} = 1.865$ ,  $g_{yy} = 1.942$ ,  $g_{zz} = 2.05$  ( $F_A^{\cdot-}$ ); blau:  $g_{xx} = 1.880$ ,  $g_{yy} = 1.927$  und  $g_{zz} = 2.064$  ( $F_B^{\cdot-}$ ); rot:  $g = 2.05$ ,  $1.942$ ,  $1.927$  und  $1.89$  ( $F_A^{\cdot-}F_B^{\cdot-}$ )

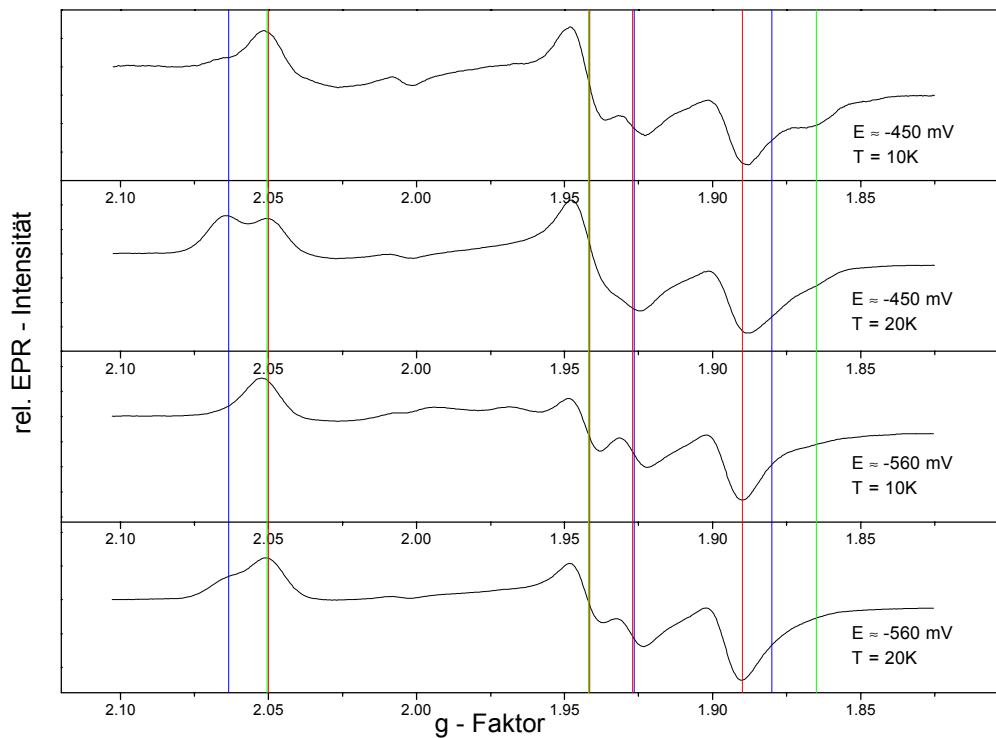


Abb. 5.5: EPR-Signale der Eisen-Schwefel-Zentren aus trimerem PS I aus *Synechococcus elongatus* in Abhängigkeit von zwei Temperaturwerten (10 K und 20 K) für eine teilweise (-450 mV) und eine vollständig reduzierte Probe (-560 mV).

Parameter: 9.440 GHz, 10 mW Mikrowellenleistung, 5 G Modulationsamplitude bei 100 kHz

grün:  $g_{xx} = 1.865$ ,  $g_{yy} = 1.942$ ,  $g_{zz} = 2.05$  ( $F_A^{\cdot-}$ ); blau:  $g_{xx} = 1.880$ ,  $g_{yy} = 1.927$  und  $g_{zz} = 2.064$  ( $F_B^{\cdot-}$ ); rot:  $g = 2.05$ ,  $1.942$ ,  $1.927$  und  $1.89$  ( $F_A^{\cdot-}F_B^{\cdot-}$ )

Abb. 5.5 zeigt die Änderung der Spektren für zwei Redoxpotentiale jeweils bei den Temperaturen 10 K und 20 K, die einen signifikanten Unterschied zeigen. Bei  $E = -450$  mV und 10 K treten eindeutig Signale bei  $g = 1.864$  und  $g = 1.927$  auf, was den Schluß zuläßt, daß sowohl Reaktionszentren mit ausschließlich  $F_A^{\cdot-}$  als auch Zentren mit  $F_A^{\cdot-}F_B^{\cdot-}$  vorliegen. Dieselbe Probe bei  $T = 20$  K zeigt ein Spektrum mit einem ausgeprägten Signal bei  $g = 2.064$  und weist damit scheinbar auf einen Teil an Zentren hin, bei denen ausschließlich  $F_B^{\cdot-}$  vorliegt. Die Signale bei  $g = 1.864$  und  $g = 1.927$  sind dafür nur noch annähernd halb so groß. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß in den Proben ähnliche Anteile von Zentren, bei denen nur  $F_A$  reduziert ist, vorliegen, wie Zentren, bei denen nur  $F_B$  reduziert ist, da die Intensität der einzelnen g-Faktoren temperaturabhängig ist [88].

Ebenfalls Unterschiede zeigt die Probe bei  $E = -560$  mV, die bei  $T = 10$  K noch ein schwaches Signal bei  $g = 1.864$  aufweist, das bei  $T = 20$  K nicht mehr sichtbar ist, dafür aber ein Signal bei  $g = 2.064$  zeigt. Da hier davon ausgegangen wird, daß beide Eisen-Schwefel-

Zentren reduziert sind, gilt die für  $E = -450 \text{ mV}$  aufgestellte Hypothese nicht mehr. Diese muß um den Aspekt erweitert werden, daß die Spin-Spin-Kopplung der FeS-Zentren mit zunehmender Temperatur abnimmt und damit vermehrt das Summensignal von  $F_A^-$  und  $F_B^-$  beobachtet wird.

Mit Hilfe der EPR soll noch ein weiterer Punkt überprüft werden. Die Frage, ob sich durch die Messung ohne Mediatoren an den Eisen-Schwefel-Zentren ein anderes Potential einstellt als in der umgebenden Lösung, ist für alle Messungen relevant. Da bei den optischen Messungen nicht die Möglichkeit besteht, vergleichende Messungen mit Mediatoren durchzuführen, soll dies bei den EPR-Messungen erfolgen. Um zu zeigen, daß das Potential an den Eisen-Schwefel-Zentren nicht positiver ist als mit Mediatoren, wird eine Messung mit Methylviologen bei  $E = -405 \text{ mV}$  durchgeführt. Wenn das Potential mit Mediatoren negativer wäre, sollte hier ein deutliches EPR-Signal zu sehen sein, denn ohne Mediatoren können bei  $E = -405 \text{ mV}$  nur die ersten Anzeichen einer Reduktion nachgewiesen werden. Wenn das Potential mit Mediatoren positiver wäre, müßte man bei  $E = -505 \text{ mV}$  ein Spektrum erhalten, das eine noch nicht vollständig reduzierte Probe zeigt; denn ohne Mediatoren entspricht das

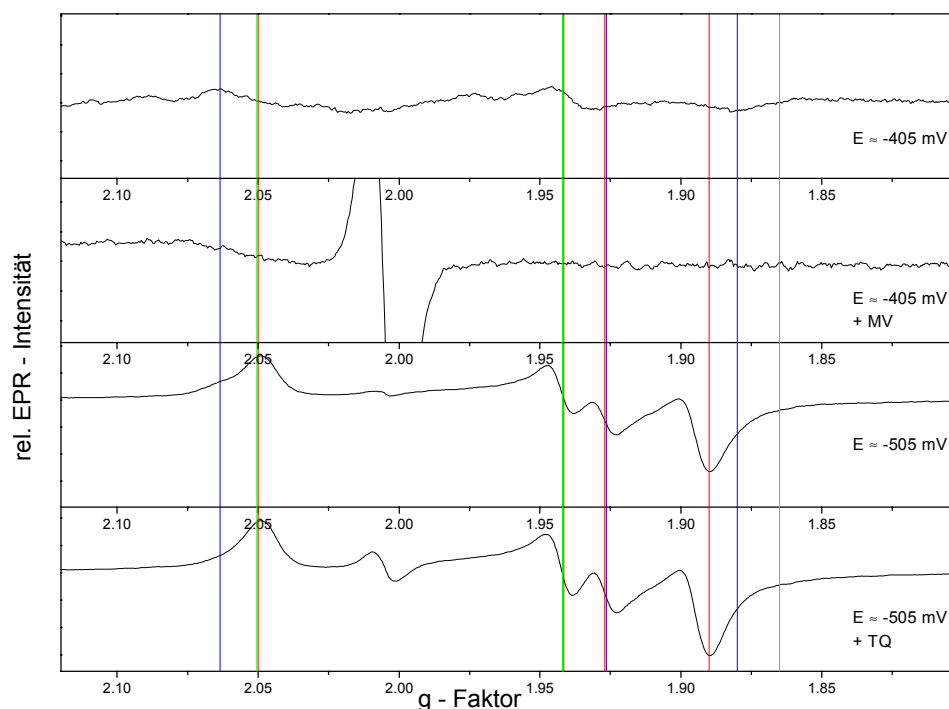


Abb. 5.6: EPR-Signale der Eisen-Schwefel-Zentren aus trimerem PS I aus *Synechococcus elongatus* für zwei unterschiedliche Redoxpotentiale mit und ohne Mediator (bei  $-405 \text{ mV}$  mit Methylviologen, bei  $-505 \text{ mV}$  mit Triquat). Parameter:  $9.440 \text{ GHz}$ ,  $10 \text{ mW}$  Mikrowellenleistung,  $5 \text{ G}$  Modulationsamplitude bei  $100 \text{ kHz}$ , Temperatur  $10 \text{ K}$   
grün:  $g_{xx} = 1.865$ ,  $g_{yy} = 1.942$ ,  $g_{zz} = 2.05$  ( $F_A^-$ ); blau:  $g_{xx} = 1.880$ ,  $g_{yy} = 1.927$  und  $g_{zz} = 2.064$  ( $F_B^-$ ); rot:  $g = 2.05$ ,  $1.942$ ,  $1.927$  und  $1.89$  ( $F_A^- F_B^-$ )

Signal einer gerade vollständig reduzierten Probe. Deshalb wurde eine weitere vergleichende Messung bei  $E = -505 \text{ mV}$  mit Triquat durchgeführt.

Wie aus der Abbildung Abb. 5.6 ersichtlich ist, gibt es keine signifikanten Änderungen der Spektren. Die Signale, die bei  $g = 2.00$  auftreten, stammen lediglich von den verwendeten reduzierten Mediatoren. Man könnte die Messungen so deuten, daß die Probe bei  $E = -405 \text{ mV}$  mit Mediatoren weniger reduziert ist als ohne. Dies liegt aber im Rahmen der Genauigkeit der Vorbereitung zweier Proben und wäre auch im Gegensatz zur Messung bei  $E = -505 \text{ mV}$ .

Eine exakte Zuweisung der Amplitudenanteile zu den Potentialwerten vorzunehmen und dadurch das Halbstufenpotential zu bestimmen, ist aus verschiedenen Gründen nicht möglich:

- Die absolute Amplitude schwankte bei den Messungen um den Faktor 3.5, obwohl die EPR-Röhrchen in Länge und Durchmesser vermessen wurden und alle Proben aus einer Stammlösung stammten.
- Die relative Signalamplitude konnte nicht sicher bestimmt werden, da sich die Temperatur nicht fein genug einstellen ließ, um Signalverschiebungen wie in Abb. 5.6 ausschließen zu können.
- Die höheren Konzentrationen von Puffer, Dithionit und Probe können das vom pH-Wert abhängige Potential von dem in Abb. 3.6 abweichen lassen.
- Die Verdünnung des pH-Puffers um den Faktor 10 führt zu einer Änderung des pH-Wertes, die zwar durch Messen nach dem Auftauen der EPR-Probe und aufgrund empirischer Untersuchungen zur pH-Wert-Änderung beim Verdünnen korrigiert wurde, aber nicht die Präzision des direkt gemessenen pH erreichte.

Die Ergebnisse aus den EPR-Messungen stehen aber qualitativ im guten Einklang mit den Ergebnissen aus den optischen Messungen bei Raumtemperatur. Die bei  $-405 \text{ mV}$  erkennbaren Signale für reduziertes FeS stimmen mit den optisch gefunden  $15 \% - 20 \% F_B^-$  für diesen Potentialbereich sehr gut überein. Auch das EPR-Signal für die vollständig reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren bei  $-505 \text{ mV}$  ist in guter Übereinstimmung für die Raumtemperaturmessungen, die bei diesem Potential ca.  $90 \% (F_A^- F_B^-)$  ergeben haben.

Durch die vergleichenden Messungen mit und ohne Mediator wird weiterhin der Schluß gezogen, daß die Potentialeinstellung über den pH ohne Mediatoren vollständig erfolgt.



### 5.2.2.2 Untersuchung der bei stark reduzierenden Bedingungen verbleibenden 10 ms Kinetik

Erwartungsgemäß sollte bei vollständiger Reduktion bei pH 10.0 die 10 ms Kinetik nicht mehr zu beobachten sein. Da aber ein Absinken des Amplitudenanteils der 10 ms Kinetik unter 10 % nicht beobachtet wurde, sind zusätzliche Messung erfolgt, um abschätzen zu können, ob das beobachtete Restsignal mit einer Halbwertszeit von 10 ms tatsächlich einer Rekombination mit dem  $P700^+$  zugeordnet werden kann.

Da die Absorptionsdifferenz bei 703 nm spezifisch durch das Redoxpaar  $P700/P700^+$  bestimmt ist, wurde der Rekombinationstransient bei 703 nm aufgezeichnet um sicherzustellen, daß es sich um eine Rekombination mit  $P700^+$  handelt (Abb. 5.7, Unten). Dieses Signal ist mit sehr geringem Meßlicht aufgezeichnet worden, um das sensible Redoxgleichgewicht nicht durch lichtinduzierte Ladungstrennung zu verschieben. Die Verringerung der Meßlichtintensität führt jedoch zu dem schlechten Signal/Rauschverhältnis.

Der Transient bei 703 nm ist in der Abb. 5.7 im Vergleich zur Standardmessung bei 826 nm dargestellt. Sie weisen im Rahmen der Meßgenauigkeit keine große Abweichung im prozentualen Anteil der 10 ms Kinetik auf, wodurch die Rekombination des  $P700^+$  mit einem Eisen-Schwefel-Zentrum am wahrscheinlichsten ist.

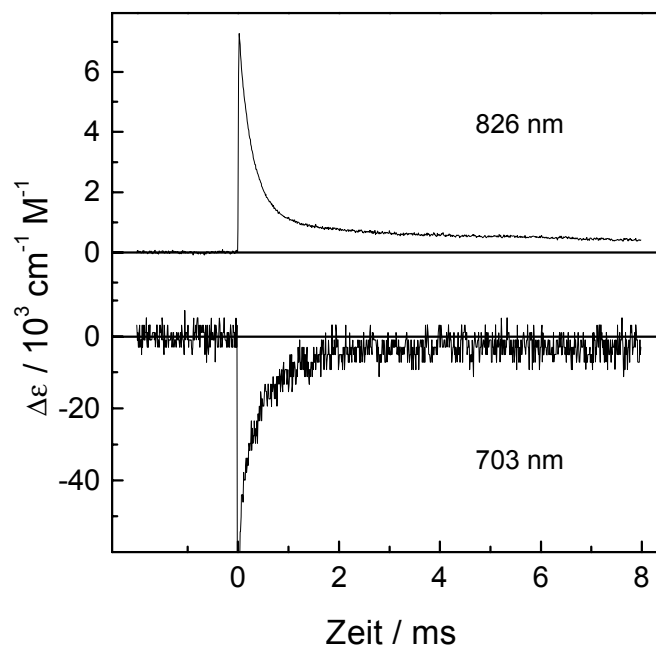
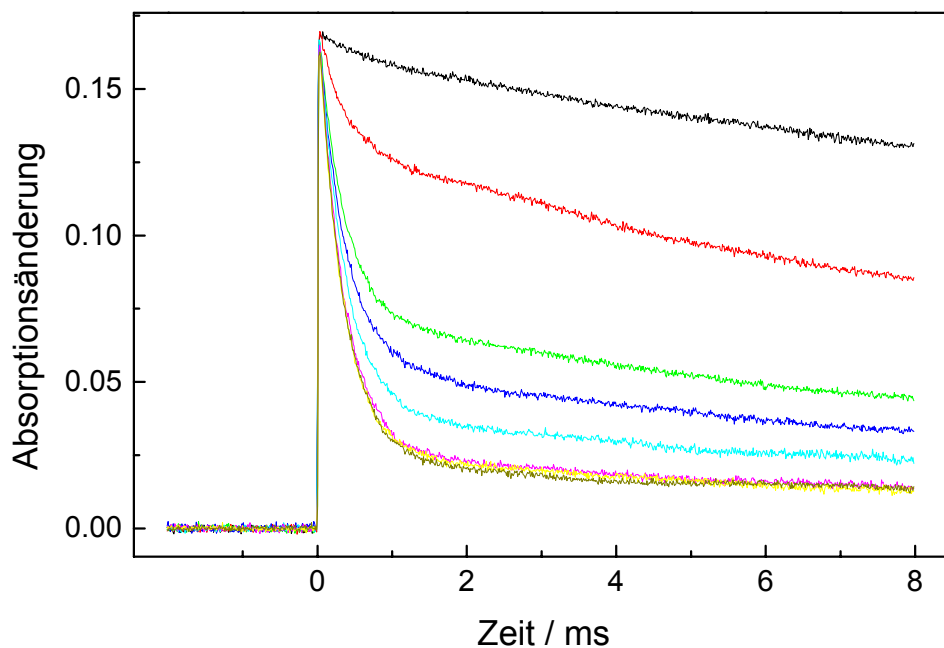


Abb. 5.7: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm und 703 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
Meßbedingungen: vollständige Reduktion mit Dithionit bei pH = 10.0

Durch weitere Messungen, die auf drei unterschiedlichen Methoden beruhen, sollte Gewißheit darüber geschaffen werden, daß die reduzierende Wirkung des Dithionit auf die Eisen-Schwefel-Zentren ausreichend ist.

- I. Eine Probe wurde bei pH 10.5 mit intensivem Weißlicht durch Ladungstrennung zusätzlich reduziert. Die unmittelbar nach der Belichtung beobachtete 20  $\mu$ s Kinetik mit 50 % Amplitudenanteil zeigt die erfolgreiche reduzierende Wirkung des Weißlichtes. Nach ca. 5 min nimmt das Signal jedoch wieder seine ursprüngliche Form mit ca. 10 % 10 ms Kinetik an, die sich auch in den darauffolgenden 2 Stunden nicht signifikant ändert.
- II. Die Probe wurde bei höheren pH-Werten bis pH 12.0 und mit bis zu dreifachen Dithionitkonzentrationen reduziert. Die daraus resultierende nicht reproduzierbare fortschreitende Änderung des Transienten läßt als einzigen Schluß die Zerstörung der essentiellen Proteine zu. Selbst unter diesen Bedingungen konnte keine Abnahme der 10 ms Kinetik beobachtet werden.



*Abb. 5.8: Einstellung des Redoxgleichgewichtes mit der Zeit  
Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von  
trimeren PS I-Komplexen aus Synechococcus elongatus  
Meßbedingungen:  
[Chl a] = 20  $\mu$ M, pH = 10.5, 500 nM PMS und 1.5 mM Dithionitzugabe  
Die Transienten sind von oben nach unten 1 min, 3 min, 10 min, 16 min,  
27 min, 57 min, 63 min und 69 min nach Dithionitzugabe aufgenommen  
worden.*

III. Bei der Reduktion mit Dithionit wurde 500 nM PMS als Mediator hinzugefügt, um eine sichere Einstellung des Redoxgleichgewichtes mit den Eisen-Schwefel-Zentren zu gewährleisten. Wie die Abb. 5.8 jedoch zeigt, nimmt die 10 ms Kinetik in ihrem Amplitudenanteil nach Einstellung des Gleichgewichtes auch nicht ab, obwohl es zu einer wesentlich schnelleren Einstellung des Redoxgleichgewichtes kommt.

### 5.3 Diskussion

Aus den optischen Messungen an *Synechococcus elongatus* erhält man für das Redoxpaar  $(F_A F_B) / (F_A F_B)^{\cdot-}$  ein Halbstufenpotential von  $(-440 \pm 10)$  mV und für das Redoxpaar  $(F_A F_B)^{\cdot-} / (F_A^{\cdot-} F_B^{\cdot-})$  ein Halbstufenpotential von  $(-465 \pm 10)$  mV. Die EPR-Messungen stehen im Einklang mit diesem Ergebnis. Die optisch bestimmten Halbstufenpotentiale für die Eisen-Schwefel-Zentren in *Chlamydomonas reinhardtii* sind mit  $(-420 \pm 20)$  mV und  $(-440 \pm 20)$  mV nur unwesentlich positiver als die von *Synechococcus elongatus*.

Die Abweichung der gefundenen Halbstufenpotentiale zu den Literaturwerten (Tabelle 1.1) kann verschiedene Ursachen haben. Für alle Literaturdaten wurde versucht das eingestellte Potential unter Zugabe von Mediatoren direkt zu messen. Für die EPR-Messungen wurde anschließend die Probe unter anaeroben Bedingungen in das EPR-Röhrchen überführt. Die Einstellung des Redoxpotentials ist in diesem Redoxbereich jedoch sehr instabil, da das Dithionit auch unter anaeroben Bedingungen zerfällt. Zusätzlich gibt es nicht genügend Mediatoren, um den Redoxbereich mit genügend kleinen Schritten abzudecken. Meist wurde Benzylviologen ( $E_m = -350$  mV), Methylviologen ( $E_m = -446$  mV) und Triquat ( $E_m = -550$  mV) verwendet. Problematisch ist zudem, daß nach eigenen Untersuchungen Triquat bei basischen pH-Werten zerfällt. Ohne Mediatoren wird das Potential nicht ausreichend lange stabil sein, damit sich das Redoxgleichgewicht auch innerhalb des Proteins einstellen kann. Jede Änderung des Potentials der Meßlösung bis zur eigentlichen Messung, die nur zu positiveren Werten erfolgen kann, hat ein zu negativ bestimmtes Halbstufenpotential zur Folge. Wird dieses instabile System nun für die EPR-Messungen auch noch in ein neues Gefäß überführt, ist eine Drift zu einem positiveren Potential zu vermuten. Für diese Hypothese spricht, daß die EPR-Messungen tendenziell negativere Werte liefern als die optischen Messungen.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode dient das Wasser in Abhängigkeit des pH-Wertes als Mediator und durch seinen hohen Überschuß gleichzeitig als Begrenzung des eingestellten Redoxpotentials zu negativen Werten. Dadurch kann Dithionit im Überschuß

zugegeben werden. Dessen Zerfall hat dann nur noch einen geringen Einfluß auf das Potential. Die so erreichte Stabilität des Redoxpotentials ist ausreichend, um eine Gleichgewichtseinstellung im Protein zu gewährleisten und über die Dauer der Messung konstant zu sein.

Ein weiteres Problem bei den in der Literatur angegebenen Messungen stellt der verwendete pH-Wert dar. Um das Redoxpotential über einen ausreichend weiten Bereich titrieren zu können, wurden sehr basische Werte um  $\text{pH} = 10.0$  verwendet. Dieser ist weit von dem physiologischen pH entfernt. Da eine pH-Abhängigkeit des Halbstufenpotentials der Eisen-Schwefel-Zentren nicht ausgeschlossen werden kann, ist auch hier die in dieser Arbeit verwendete Methode von Vorteil, da der relevante Meßbereich um die Halbstufenpotentiale bei pH 6.0 bis pH 7.5 liegt.

Eine weitere Möglichkeit ist aber auch, daß die Unterschiede bei den bestimmten Halbstufenpotentialen der Eisen-Schwefel-Zentren lediglich auf die untersuchte Spezies zurückzuführen ist.

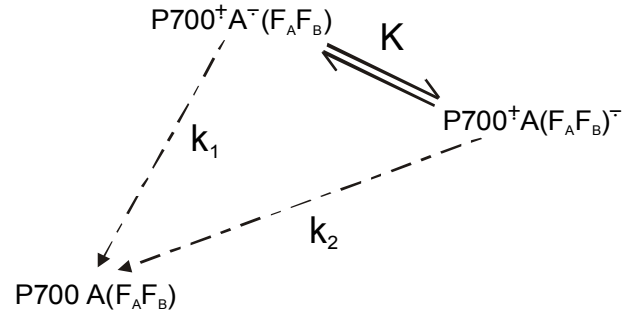
Eine wichtiges Kriterium zur Plausibilitätskontrolle der gefundenen Redoxpotentiale ist das Halbstufenpotential vom Ferredoxin. Liegt dieses nicht eindeutig unter dem Halbstufenpotential von  $(-440 \pm 10) \text{ mV}$ , kann ein Elektronentransfer aus dem PS I-Protein auf das lösliche Ferredoxin nicht oder nur unvollständig erfolgen. Die in der Literatur für das Ferredoxin angegebenen Halbstufenpotentiale liegen in Abhängigkeit der Spezies zwischen  $-325 \text{ mV}$  und  $-425 \text{ mV}$  (siehe Übersichtsartikel [95] von 1977). Dem Halbstufenpotential in unserem biologischen System am ähnlichsten sind, neben dem aus der Zeit des Übersichtartikels schon bekannten Potential von Spinat  $-420 \text{ mV}$  [96], das inzwischen bestimmte Potential von  $-412 \text{ mV}$  für *Synechocystis* sp PCC 6803 [97] und  $-385 \text{ mV}$  für *Synechococcus* 6301 [98]. Legt man das Halbstufenpotential vom Ferredoxin aus *Synechococcus* 6301 zugrunde, ist der Vorwärtselektronentransfer unproblematisch. Selbst für Ferredoxin aus Spinat, welches das negativste gemessene Halbstufenpotential für Ferredoxine aus höheren Pflanzen besitzt, würde eine vollständige Abgabe des Elektrons an Fd erfolgen, da das reduzierte Ferredoxin sich vom PS I-Komplex ablöst und damit aus dem Gleichgewicht ( $K \approx 2$ ) entfernt.

## 6 Aktivierungsenergie für die Ladungsrekombinationsreaktion $P700^+$ mit $(F_A F_B)^-$

### 6.1 Einführung

In diesem Kapitel soll geklärt werden, über welchen Weg die Ladungsrekombination zwischen  $P700^+$  und  $(F_A F_B)^-$  erfolgt.

Die möglichen Reaktionswege sind in Schema 6.1 dargestellt. Eine Möglichkeit ist die direkte Rekombination mit einer Ratenkonstanten  $k_2$ . Abschätzungen auf der Basis der Marcus-Theorie zeigen allerdings (siehe Seite 84), daß eine direkte



Schema 6.1: Mögliche Rekombinationswege für das  $P700^+ A(F_A F_B)^-$ , mit  $A = A_0, A_1$  oder  $F_x$

Rekombination viel zu langsam ist, um die gemessene Halbwertszeit  $t_{1/2} = \ln 2/k_r$  von 95 ms für die Ladungsrekombination von  $P700^+(F_A F_B)^-$  zu erklären.

Eine zweite Möglichkeit ist, daß die Rekombination über einen in der Elektronentransferkette vorgelagerten Akzeptor A erfolgt. Bei A kann es sich dabei um  $F_x$ ,  $A_1$  oder  $A_0$  handeln. In diesem Fall läßt sich der folgende Zusammenhang zwischen der gemessenen Ratenkonstanten  $k_r$  und der molekularen Ratenkonstanten  $k_1$  für die Rekombination von  $P700^+ A^-$  herleiten:

Für die Rereduktion von  $P700^+$  gilt:

$$\frac{d([P700^+ A^-(F_A F_B)] + [P700^+ A(F_A F_B)^-])}{dt} = k_1 [P700^+ A^-(F_A F_B)] \quad \text{Gl. 6.1}$$

mit  $[P700^+ A^-(F_A F_B)] + [P700^+ A(F_A F_B)^-] = [P700^+](t)$  und  $[P700^+ A^-(F_A F_B)] = \frac{[P700^+](t)}{1+K}$  gilt:

$$k_1 [P700^+ A^-(F_A F_B)] = k \frac{1}{1+K} [P700^+](t) \text{ und damit:} \quad \text{Gl. 6.2}$$

$$k_r = k_1 \frac{1}{1+K} \quad \text{Gl. 6.3}$$

Da  $K$  in der Regel sehr viel größer als 1 ist, folgt mit  $RT \ln(K) = -\Delta G^0$ :

$$k_r = k_1 \cdot e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} \quad \text{Gl. 6.4}$$

Für den Elektronenvorwärtstransfer geht man davon aus, daß die Aktivierungsenergie zwischen den einzelnen Schritten klein ist. Gegenüber der Aktivierungsenergie für die Rekombination ist sie sogar zu vernachlässigen. Bestimmt man unter dieser Voraussetzung für einen Teilschritt der Rekombination die Aktivierungsenergie, gilt:

$$\Delta G_{\text{vorwärts}}^0 \approx -E_{\text{A,rückwärts}}$$

Aus einem Vergleich mit der Arrhenius-Gleichung

$$k_r = k_{\text{max}} \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{Gl. 6.5}$$

läßt sich weiter schließen, daß die Rekombinationsrate  $k_1$  der Maximalrate  $k_{\text{max}}$  entspricht.

Trägt man den natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen die reziproke absolute Temperatur auf, kann aus der Steigung die Aktivierungsenergie und aus dem Achsenabschnitt die Ratenkonstante für die Rekombination zwischen  $P700^+$  und  $A^-$  bestimmt werden.

In der Literatur sind für die Aktivierungsenergie der Rekombinationsreaktion des ladungsgetrennten Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$  in den Grundzustand zwei stark voneinander abweichende Werte veröffentlicht worden. Der von Vos et al. mit 460 meV [31] bestimmte Wert spricht eher für eine Rekombination mit dem Zwischenprodukt  $P700^+ A_0^-$ , während die von Shuvalov et al. bestimmte Aktivierungsenergie von 200 meV [32] für eine Rekombination über den ladungsgetrennten Zustand  $P700^+ A_1^-$  spricht.

Um diese Diskrepanz zu klären, wurde die Aktivierungsenergie erneut bestimmt. Hierzu wurde die Temperaturabhängigkeit der Halbwertszeit für die Rekombination unter schwach reduktiven Bedingungen bestimmt und zusätzlich aus Transienten berechnet (siehe Gl. 4.5), die in Anwesenheit von externen Donatoren und Akzeptoren gemessen wurden.

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Messungen im Temperaturbereich von 315 K bis 275 K

#### 6.2.1.1 Temperaturabhängigkeit unter schwach reduzierenden Bedingungen

Unter schwach reduktiven Bedingungen zerfällt das ladungsgetrennte Paar  $P700^+(F_A F_B)^-$  nahezu ausschließlich durch Rekombination und der Zeitverlauf kann annähernd durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden (siehe Kapitel 4.2.1.1).

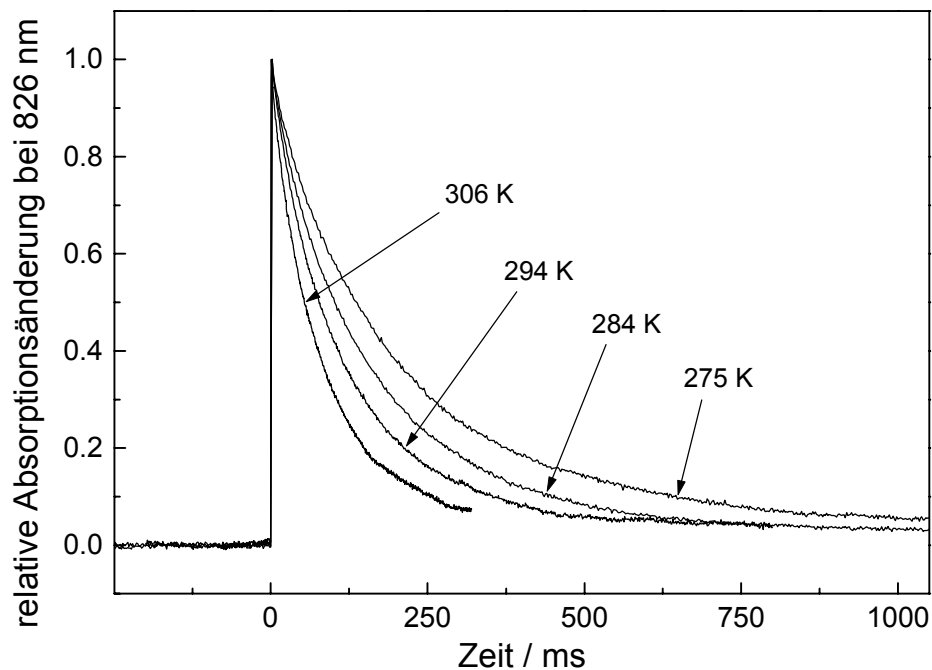


Abb. 6.1: Auswahl von vier zeitlichen Verläufen der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* in Abhängigkeit der Temperatur.

Meßbedingungen:

pH = 5.0, [Chl a] = 20  $\mu$ M, Potential mit Dithionit auf ca. -250 mV eingestellt

Für die Messungen wurde die PS I-Probe unter anaeroben Bedingungen in einer gasdichten Küvette unter Kontrolle des Redoxpotentials mit wenig Dithionit versetzt. Das Potential wurde auf ungefähr -250 mV eingestellt.

Abb. 6.1 zeigt die Absorptionsänderung bei 826 nm für verschiedene Temperaturen als Funktion der Zeit. Das Erhöhen der Temperatur von 275 K auf 306 K hat eine Verringerung der Halbwertszeit von  $\approx 150$  ms auf  $\approx 55$  ms zur Folge, was Ratenkonstanten für die Rekombination von  $4.62 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $12.60 \text{ s}^{-1}$  entspricht.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde die Rekombinationsrate in einem Temperaturbereich von 313 K bis 275 K gemessen (siehe Abb. 6.2, geschlossene Kreise). Messungen

oberhalb von 318 K konnten nicht durchgeführt werden, da bei diesen hohen Temperaturen eine Deaktivierung der Probe beobachtet wurde.

#### 6.2.1.2 Temperaturabhängigkeit unter Verwendung eines Donators

Bei den Messungen unter aeroben Bedingungen ist der Elektronentransfer zu einem externen Akzeptor möglich (siehe Kapitel 4.2.1). Damit  $P700^+$  in allen Zentren wieder rereduziert wird, wurde 2 mM Ascorbat und 200  $\mu$ M TMPD als Elektronendonator zugesetzt (siehe Kapitel 4.2.1.1). Aus dem Zeitverlauf der Absorptionsänderung, der mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen angepaßt wurde, läßt sich die Halbwertszeit für die direkte Rekombination mit Gl. 4.5 berechnen. Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 276 K bis 313 K durchgeführt. Die aus den Messungen berechneten Ratenkonstanten für die Rekombination sind ebenfalls in Abb. 6.2 aufgetragen (offene Kreise). Man erkennt, daß die Ergebnisse beider Verfahren zur Bestimmung der Aktivierungsenergie sehr gut übereinstimmen. Unter Berücksichtigung aller Meßwerte ergibt sich aus der Steigung der Geraden eine

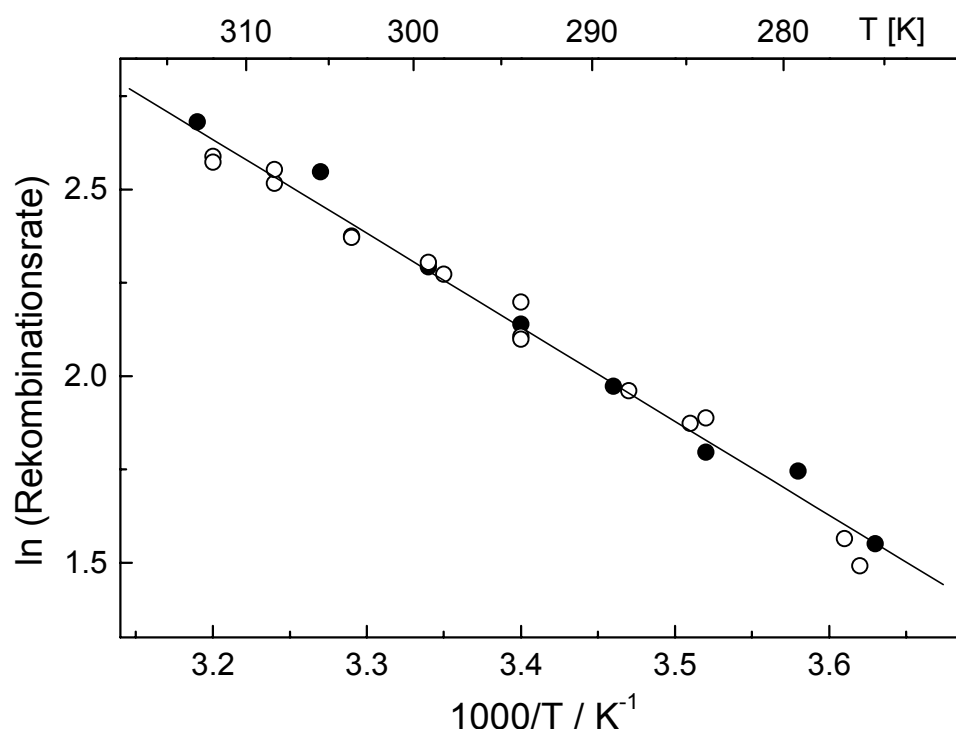


Abb. 6.2: Abhängigkeit der Rekombinationsrate von der Temperatur. Die geschlossenen Kreise sind mit der Methode der schwachen Vorreduktion gemessen, die offenen Kreise ohne Vorreduktion mit Rückrechnung der eigentlichen Rekombinationsrate aus dem Verhältnis des langsamen und des sehr langsamen Anteils. Da die Meßwerte kaum voneinander abweichen wurde nur ein Arrheniusfit durch die Ergebnisse beider Meßmethoden gelegt. Die Steigung der Geraden ergibt eine Aktivierungsenergie von  $(220 \pm 10)$  meV und ein  $k_{max}$  von  $(44 \pm 10) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ .



Aktivierungsenergie von  $(220 \pm 10)$  meV. Für  $k_{\max}$  liefert die Anpassung  $(44 \pm 10) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ . Das Ergebnis für die Aktivierungsenergie liegt nahe dem von Shuvalov et al. [32] gefundenen Wert.

Ein Vergleich mit Literaturwerten führt zu dem Schluß, daß die Rekombination über den vorgelagerten Zustand  $\text{P700}^+ \text{A}_1^-$  erfolgt (siehe Diskussion, Kapitel 6.3).

Für eine Rekombination über diesen Zwischenzustand spricht auch, daß nach der Energieaufnahme zur Erreichung des Zustandes  $\text{P700}^+ \text{A}_1^-$  keine weitere Aktivierungsenergie für die Rekombination in den Grundzustand benötigt wird [99].

Identifiziert man  $k_{\max}$  mit  $k_1$  (siehe Kapitel 6.1), sollte es größenordnungsmäßig der Rekombinationsrate des Zwischenzustandes entsprechen. Eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = \ln 2 / k_1 = 16 \text{ } \mu\text{s}$  wurde in der Literatur für die Rekombination von  $\text{P700}^+ \text{A}_1^-$  veröffentlicht [113] (siehe Diskussion).

## 6.2.2 Einfluß von Gefrierschutzmitteln auf die Rekombinationsreaktion bei Raumtemperatur

Die temperaturabhängigen Messungen sind nach oben nur durch die Stabilität des Photosystems I begrenzt, welches in unseren Versuchen ab  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  zu zerfallen begann. Will man auf der Temperaturskala unterhalb des Gefrierpunktes messen, benötigt man für optische Messungen ein Gefrierschutzmittel, das ein Kristallisieren des Lösungsmittels verhindert und die Probe in einen transparenten hochviskosen Glaszustand übergehen läßt.

Zunächst wurde die Rekombination des ladungsgetrenten Zustandes  $\text{P700}^+ (\text{F}_\text{A} \text{F}_\text{B})^-$  bei Raumtemperatur in Abhängigkeit vom Gefrierschutzmittel und dessen Konzentration untersucht. Die Rekombinationstransienten wurden unter schwach reduktiven Bedingungen gemessen, so daß der ladungsgetrente Zustand nahezu ausschließlich durch Rekombination zerfällt.

Unabhängig davon, welches Gefrierschutzmittel verwendet wurde, kam es mit steigender Volumenkonzentration zu einer Erhöhung der Rekombinationsgeschwindigkeit. In welchem Maße die Rekombination beschleunigt wird, hängt von dem jeweiligen Gefrierschutzmittel ab. Abb. 6.3 links zeigt diesen Effekt für Glycerol, Ethylenglycol und DMSO. Durch einfache Multiplikation der Zeitskala mit dem Koeffizienten  $k$  können alle Transienten ineinander überführt werden, wie Abb. 6.3 rechts zeigt. Eine Auftragung und Diskussion des Koeffizienten  $k$  erfolgt in Abb. 6.4 unter verschiedenen Gesichtspunkten.

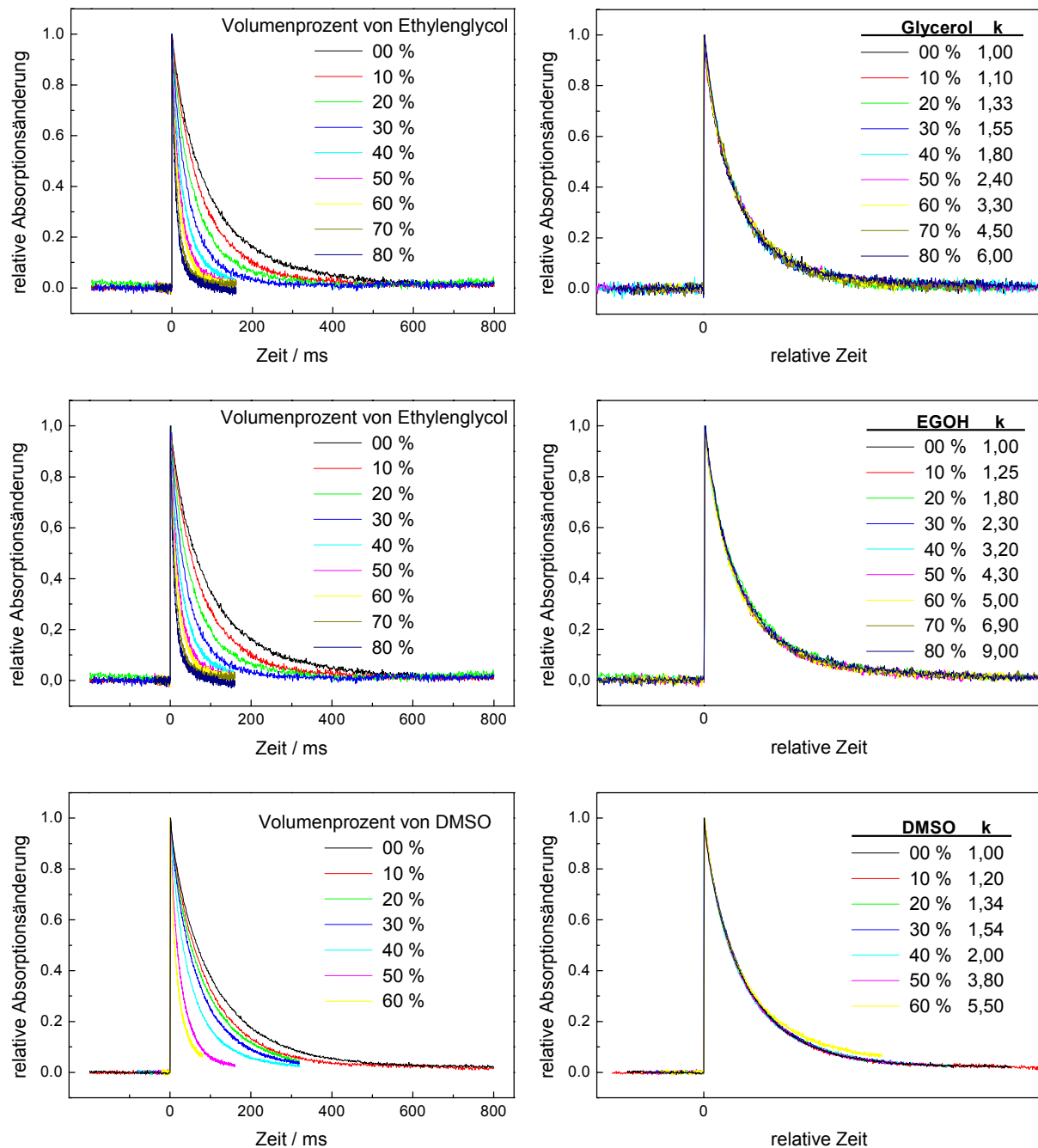


Abb. 6.3 Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* von der Gefrierschutzmittelkonzentration

Meßbedingungen:

anaerob, pH = 5.5, ca. 0.3 mM Dithionit, 10  $\mu$ M Chl a

Die dargestellten Signale sind aus 10 Einzelmessungen gemittelt.

Die rechten Abbildungen zeigen die Überführung der einzelnen Transienten durch Multiplikation der Zeitskala mit einem Koeffizienten k.

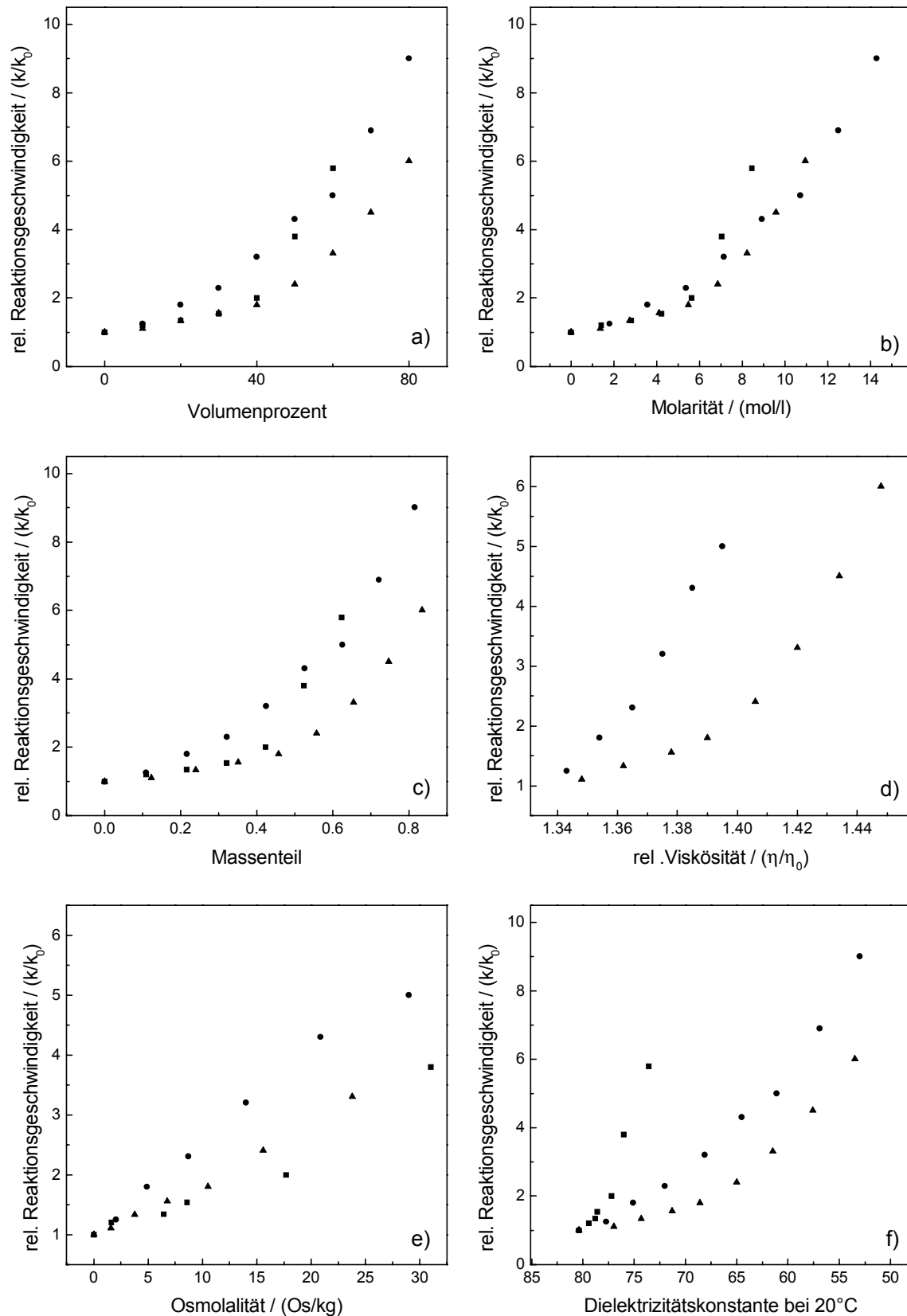


Abb. 6.4: Abhängigkeit der Rekombinationsgeschwindigkeit von den Gefrierschutzmitteln Glycerol (▲), Ethylenglycol (●) und Dimethylsulfoxid (■)  
Die Auftragung erfolgt gegen Volumenprozent (a), Molarität (b), Massenanteil (c), relative Viskosität zu Wasser (d), Osmolalität (e) und Dielektrizitätskonstante (f).

Mit folgenden Versuchen soll ein Überblick über die Wirkungsweise der Gefrierschutzmittel gewonnen werden:

1. Entfernt man das Gefrierschutzmittel durch Dialyse aus dem Puffer, erhält man die gewohnte Rekombinationszeit von  $\approx 90$  ms. Das zeigt, daß der Effekt reversibel ist.
2. Verdünnt man die Meßlösung, so wie man es zuvor an anderen Meßlösungen mit Gefrierschutzmitteln getan hat, mit entsprechenden Volumenanteilen Wasser, wird keine Veränderung der Rekombinationszeit beobachtet. Die Effekte können also nicht auf eine Verdünnung der Pufferbestandteile durch die Gefrierschutzmittel zurückgeführt werden.
3. Wie Abb. 6.5 zeigt, läßt sich mit Chinhydron bei gegebenem pH-Wert auch in 60 % Ethylenglycol noch ein stabiles Redoxpotential mit linearer Abhängigkeit einstellen (offene Kreise), das nur wenig von dem in wäßrigen Lösungen gemessenen abweicht (geschlossene Quadrate). Diese Abweichung könnte darauf zurückzuführen sein, daß eine präzise Bestimmung des pH-Wertes in hochviskosen Lösungen mit der üblichen Einstabmeßkette nicht mehr möglich ist.

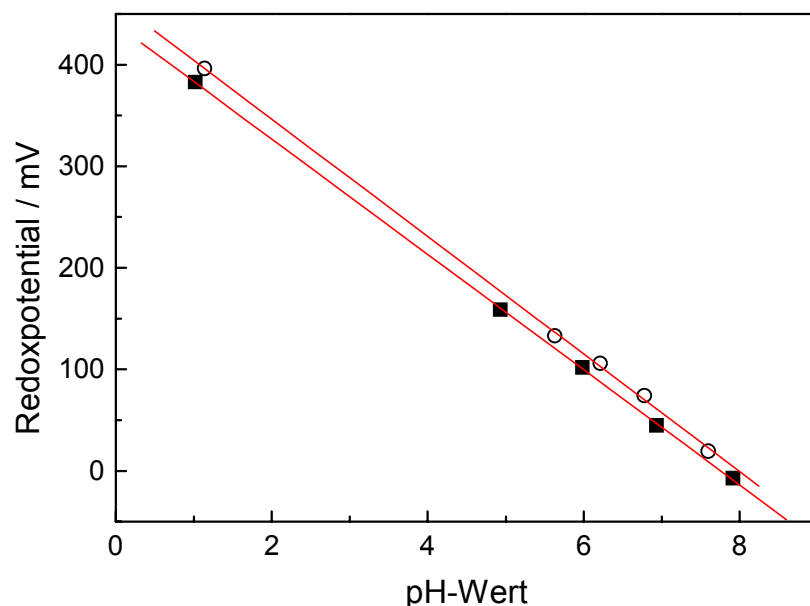


Abb. 6.5: Abhängigkeit des Redoxpotentials von Chinhydron vom pH in normalem Meßpuffer ■ und 60 % Ethylenglycol ○.

Meßbedingungen:

mit Chinhydron gesättigte Lösungen des angegeben pH-Wertes;  
das Potential wurde gegen Silber/Silberchlorid bestimmt

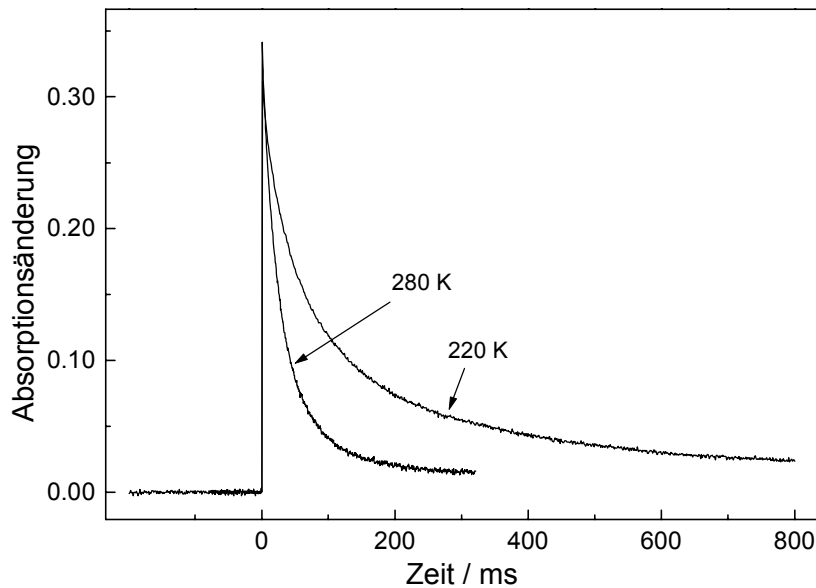


Abb. 6.6: Auswahl von vier zeitlichen Verläufen der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm von trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* in Abhängigkeit der Temperatur.

Meßbedingungen:

60 % Ethylenglycol, pH = 5.0, [Chl a] = 30  $\mu$ M, anaerob, 300  $\mu$ M Dithionit

Wird versucht, die Aktivierungsenergie trotz des Einflusses der Gefrierschutzmittel auf die Rekombinationsrate zu bestimmen (Abb. 6.6), kann eine monoexponentielle Anpassung der Transienten nicht mehr durchgeführt werden. Dies kann dadurch erklärt werden, daß unterschiedliche Konformationszustände vorliegen, so daß eine Verteilung von Ratenkonstanten resultiert. In diesem Fall läßt sich der Zeitverlauf mit einer gedehnten Exponentialfunktion (Gl. 6.6) anpassen [100, 101].

$$\Delta A = \Delta A_0 e^{-[k(T)t]^\beta} \quad \text{Gl. 6.6}$$

Die aus der Anpassung resultierenden Ratenkonstanten  $k(T)$  sind in Abb. 6.7 und Abb. 6.8 aufgetragen. Für die beiden verwendeten Gefrierschutzmittel (60 % Glycerol und 60 % Ethylenglycol) ergibt sich eine Aktivierungsenergie um 100 meV. Dieser Wert liegt ungefähr 120 meV unter der Aktivierungsenergie, die ohne Gefrierschutzmittel gemessen wurde. Das  $k_{\max}$  beträgt für die Messungen in Ethylenglycol  $(2900 \pm 500) \text{ s}^{-1}$ . Dies entspricht einer Halbwertszeit von 240  $\mu$ s für die Rekombination des vorgelagerten Zustandes. Da in der Nähe des Glasüberganges Unstetigkeiten auftreten, wurden Messungen bei Temperaturen kleiner 220 K nicht berücksichtigt.

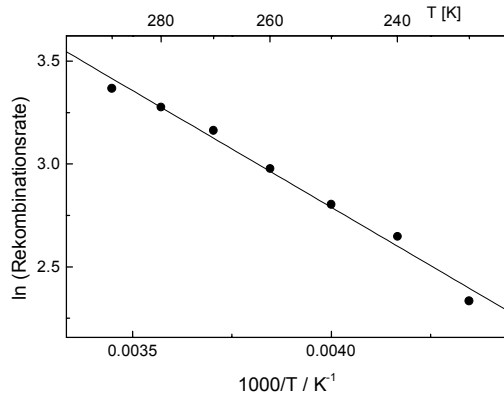


Abb. 6.7 Abhängigkeit der Rekombinationsrate von der Temperatur. Die Messungen wurden in einem Puffer mit 60 % Glycerol durchgeführt. Die Steigung der Geraden ergibt eine Aktivierungsenergie von  $(100 \pm 7) \text{ meV}$ .

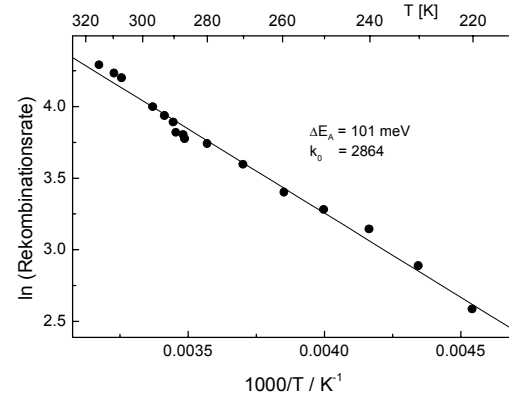


Abb. 6.8 Abhängigkeit der Rekombinationsrate von der Temperatur. Die Messungen wurden in einem Puffer mit 60 % Ethylenglycol durchgeführt. Die Steigung der Geraden ergibt eine Aktivierungsenergie von  $(100 \pm 3) \text{ meV}$  und ein  $k_0$  von  $(2900 \pm 500) \text{ s}^{-1}$ .

### 6.3 Diskussion

Um eine Aussage treffen zu können, über welchen Weg die Rekombination zwischen  $\text{P700}^{\dagger}$  und  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  erfolgt, werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im folgenden mit Daten aus der Literatur verglichen.

Der Unterschied zwischen der freien Enthalpie des Zustandes  $\text{P700}^{\dagger}\text{A}_1^-$  und der des Zustandes  $\text{P700}^{\dagger}(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  kann aus den veröffentlichten Halbstufenpotentialen abgeleitet werden. Da keine genauen Angaben über das Halbstufenpotential von  $\text{A}_1/\text{A}_1^-$  im natürlichen Elektronenvorwärtstransfer im Photosystem I in der Literatur zu finden sind, wird eine Abschätzung von Sétif und Brettel [102] verwendet, nach der sich die Halbstufenpotentiale von  $\text{A}_1/\text{A}_1^-$  und  $\text{F}_\text{X}/\text{F}_\text{X}^-$  nur geringfügig unterscheiden (Differenz zwischen +7 meV und -30 meV). Das von Chamorovsky und Cammack [103] gefundene Halbstufenpotential für  $\text{F}_\text{X}/\text{F}_\text{X}^-$  liegt bei -705 mV, ist aber sowohl bei Tieftemperatur als auch mit reduzierten nachfolgenden Kofaktoren bestimmt worden, was die bekannten Probleme mit sich bringt. Daraus folgt für das Halbstufenpotential von  $\text{A}_1/\text{A}_1^-$  ein Wert von ungefähr -720 mV.

Die Differenz aus dem gefundenen Halbstufenpotential für das Redoxpaar  $(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})/(\text{F}_\text{A}\text{F}_\text{B})^-$  von  $(-440 \pm 10) \text{ mV}$  und dem abgeschätzten Halbstufenpotential von -720 mV für  $\text{A}_1/\text{A}_1^-$  beträgt damit 280 meV. Sie ist um 60 meV größer, als die über die Temperaturabhängigkeit der Rekombinationskinetik bestimmte Energiedifferenz von 220 meV.

Diese Differenz kann schon dadurch hervorgerufen sein, daß das Halbstufenpotential von  $F_X/F_X^-$  in Anwesenheit der vorreduzierten terminalen Eisen-Schwefel-Zentren bestimmt wurde. Die Anwesenheit von  $(F_A^-F_B^-)$  in der Nähe von  $F_X$  führt sehr wahrscheinlich dazu, daß das Halbstufenpotential von  $F_X/F_X^-$  negativer wird [104, Kapitel 4.1.2]. Nach einer Untersuchung von Parrett et al. [105], die unter Abspaltung der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren und bei Raumtemperatur erfolgte, ist dieser Wert sogar um ca. 100 mV zu negativ. Dies erklärt schon alleine die Diskrepanz von 60 mV.

Eine alternative Erklärung wäre, daß die Rekombination über eine relaxierte Form des Zustandes  $P700^+A_1^-$  erfolgt. Ein analoger Vorschlag wurde für die Rekombination von  $P^+$  und  $Q_A^-$  in bakteriellen Reaktionszentren von P. Sebban [106] gemacht.

Aus der obigen Diskussion folgt, daß die Rekombination sehr wahrscheinlich über  $P700^+A_1^-$  erfolgt. Eine Rekombination über  $P700^+A_0^-$  kann ausgeschlossen werden, da aufgrund des Halbstufenpotentials von  $A_0/A_0^-$  (ungefähr -1.1 V) eine Aktivierungsenergie von 660 meV zu erwarten wäre. Die Rekombination über den ladungsgetreunten Zustand  $P700^+A_0^-$  ist zudem unwahrscheinlich, da bei der Rekombination von  $A_0^-$  das optisch registrierbare Triplett  $^3P700$  gebildet wird [107]. Dieses wird jedoch bei den Rekombinationsreaktionen von  $P700^+A_1^-$  weder beobachtet, wenn die nachfolgenden Kofaktoren entfernt sind [108], noch wenn nur  $F_A$  und  $F_B$  reduziert sind [87]. Lediglich wenn alle drei Eisen-Schwefel-Zentren reduziert sind, wird eine solche Triplettbildung beobachtet [109], was aber sicherlich nicht dem Zustand im natürlichen Elektronenvorwärtstransfer entspricht. Damit kann  $P700^+A_0^-$  als Zwischenprodukt bei der Rekombination von  $P700^+(F_AF_B)^-$  ausgeschlossen werden.

Gegen eine Rekombination über  $F_X$ , die aufgrund des Halbstufenpotentials von  $F_X/F_X^-$  nicht ausgeschlossen werden kann, sprechen die ermittelten  $k_0$ -Werte. In wäßriger Lösung betrug  $k_0$   $44000\text{ s}^{-1}$ , was einer Halbwertszeit von 16  $\mu\text{s}$  entspricht. In Anwesenheit eines Gefrierschutzmittels (60 % Ethylenglycol) ergab sich ein  $k_0$  von  $2900\text{ s}^{-1}$ , was einer Halbwertszeit von 240  $\mu\text{s}$  entspricht. Für die Rekombination von  $P700^+F_X^-$  wird aber nach Entfernen der Eisen-Schwefel-Zentren  $F_A$  und  $F_B$  eine Halbwertszeit von 750  $\mu\text{s}$  bis 1.2 ms beschrieben [110, 111, 112]. Somit sprechen die aus den  $k_{\text{max}}$ -Werten bestimmten Halbwertszeiten gegen eine Rekombination über  $P700^+F_X^-$ .

Die aus der Temperaturabhängigkeit bestimmten Halbwertszeiten sind hingegen in der Literatur für die Rekombination von  $P700^+A_1^-$  zu finden. Eine Halbwertszeit für die Rekombi-

nation von 250  $\mu\text{s}$  wurde in der Arbeit [87] unter Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren  $F_A$  und  $F_B$  bei  $\text{pH} = 10.0$  bestimmt. Die Autoren gehen davon aus, daß das Energieniveau des  $F_X$  durch das elektrostatische Feld von  $F_A^- F_B^-$  so weit angehoben ist, daß es zu keiner Reduktion des  $F_X$  kommt, sondern das System aus dem Zustand  $P700^+ A_1^-$  rekombiniert. In dem Übersichtsartikel von K. Brettel [104] wird jedoch diskutiert, daß diese Zuweisung unvollständig ist, da die Zustände  $P700^+ A_1^- F_X$  und  $P700^+ A_1 F_X^-$  in einem Gleichgewicht vorliegen und damit der beobachtete zeitliche Verlauf der Absorptionsänderung ein Resultat aus den parallel ablaufenden Rekombinationsreaktionen der beiden ladungsgetrennten Zustände ist.

In einer anderen Arbeit [113] wurden die dem  $A_1$  folgenden Kofaktoren durch Inkubation mit 3 M Harnstoff und 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) entfernt. So kann die Rekombination von  $P700^+ A_1^-$  ohne Zusätze von Reduktionsmitteln bestimmt werden. Aus dieser Arbeit gehen zwei Halbwertszeiten hervor,  $t_{1/2,1} = 10 \mu\text{s}$  und  $t_{1/2,2} = 110 \mu\text{s}$  in einem Verhältnis von etwa 2.5 zu 1. Laut den Autoren spiegelt das Ergebnis aus der Arbeit [87] den natürlichen Zustand nicht gut wieder, da das elektrostatische Feld bei Reduktion der nachfolgenden Kofaktoren auch Auswirkungen auf das Energieniveau des Redoxpaares  $A_1/A_1^-$  hat. Andererseits wird in der Arbeit [113] selbst auch diskutiert, daß das Entfernen der Eisen-Schwefel-Zentren einen Einfluß auf das Energieniveau des  $A_1$  haben kann. Im Übersichtsartikel [104] wird diese Vermutung weitergehend diskutiert. Hier wird davon ausgegangen, daß die Entfernung der Eisen-Schwefel-Zentren zu einer Erhöhung des Halbstufenpotentials von  $A_1/A_1^-$  führt. Da sich die Rekombination zum P700-Grundzustand in der invertierten Marcus-Region befindet, würde dies eine schnellere Rekombination zur Folge haben. Vermutlich ist das  $A_1$  durch die fehlenden Eisen-Schwefel-Zentren weniger gut von dem wäßrigen Lösungsmittel abgeschirmt, was zu einer Erhöhung der Reorganisationsenergie führt. Diese Erhöhung der Reorganisationsenergie hätte ebenfalls eine schnellere Rekombination zur Folge.

Die Übereinstimmung des  $k_{\text{max}}$ -Wertes in wäßriger Lösung mit dem Wert aus der Arbeit [113], läßt sich damit begründen, daß beide Messungen ohne vorreduzierte Eisen-Schwefel-Zentren gemessen wurden. Entsprechend stimmt die Halbwertszeit, die bei negativen Redoxpotentialen gefunden wurde (siehe Kapitel 4.2.3), gut mit dem Wert aus der Arbeit [87] überein. Hier sind bei beiden Messungen die Eisen-Schwefel-Zentren  $F_A$  und  $F_B$  vorreduziert gewesen.

Für die tendenzielle Übereinstimmung des  $k_0$  aus den Messungen mit 60 % Ethylenglycol mit dem Ergebnis aus Arbeit [87] muß hingegen eine gesonderte Erklärung gefunden werden. Es



wird vermutet, daß sich der Effekt der Gefrierschutzmittel auch noch auf das  $A_1$  wirkt. Möglicherweise verringert sich die Polarität in der Umgebung von  $A_1$ , was zu einer Verringerung der Reorganisationsenergie und damit zu einem negativeren Halbstufenpotential von  $A_1/A_1^-$  und einer Verlangsamung der Rekombinationsreaktion führen würde. Da die bestimmte Aktivierungsenergie ebenfalls wesentlich geringer ist ( $\approx 100$  meV), ist zu vermuten, daß das Halbstufenpotential von  $(F_A F_B)/(F_A F_B)^-$  aus demselben Grunde bis zu 120 mV negativer geworden ist.

Durch Umformung der Gl. 6.4 nach  $\Delta G^0$  kann man die Differenz der freien Enthalpie aus der in dieser Arbeit bestimmten Halbwertszeit  $t_{1/2} = 95$  ms und den ermittelten  $k_{\max}$ -Werten berechnen. Man erhält mit dem  $k_{\max}$  von  $44000 \text{ s}^{-1}$  in wäßrigen Lösungen ein  $\Delta G^0$  von 220 meV, was exakt mit der in wäßriger Lösung bestimmten Aktivierungsenergie übereinstimmt. Für die Messungen in 60 % Ethylenglycol ergibt sich mit  $t_{1/2} = 19$  ms und  $k_0 = 2900 \text{ s}^{-1}$  ein  $\Delta G^0$  von 112 meV, was ebenfalls sehr gut übereinstimmt.

Abschließend soll mit einer Abschätzung, die auf der Elektron-Transfer-Theorie von Marcus beruht [114], gezeigt werden, daß eine direkte Rekombination dieses ladungsgetrennten Zustandes ohne Einbeziehung der anderen Kofaktoren unmöglich erscheint. Einleitend wird hierzu ein Einblick in die Theorie gegeben [104].

Nach der Elektron-Transfer-Theorie kann die Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{ET}$  für den Transfer  $D^+A \rightarrow DA^+$  mit Fermis zweiter goldener Regel in einem nicht adiabatischen (diabatischen) Ansatz berechnet werden, wenn es sich um ein elektronisch schwach gekoppeltes Donator/Akzeptor-Paar handelt:

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{DA}|^2 (\text{F.C.}) \quad \text{Gl. 6.7}$$

$|T_{DA}|^2$  ist ein Maß für die elektronische Kopplung zwischen D und A. (F.C.) ist der Franck-Condon Faktor, der später genauer beschrieben wird. Die Abhängigkeit der elektronischen Kopplung vom Abstand und Medium zwischen dem Paar läßt sich aus folgender Gleichung erkennen:

$$|T_{DA}|^2 = |T_{DA,\max}|^2 e^{-\beta r} \quad \text{Gl. 6.8}$$

Hierbei ist  $r$  der "edge to edge" Abstand zwischen Donator und Akzeptor,  $|T_{DA,\max}|^2$  die maximale elektronische Kopplung und  $\beta$  der exponentielle Koeffizient für den Abfall der elektronischen Kopplung mit  $r$ .  $\beta$  beträgt in Vakuum ungefähr  $2.8 \text{ \AA}^{-1}$  und für eine kovalente

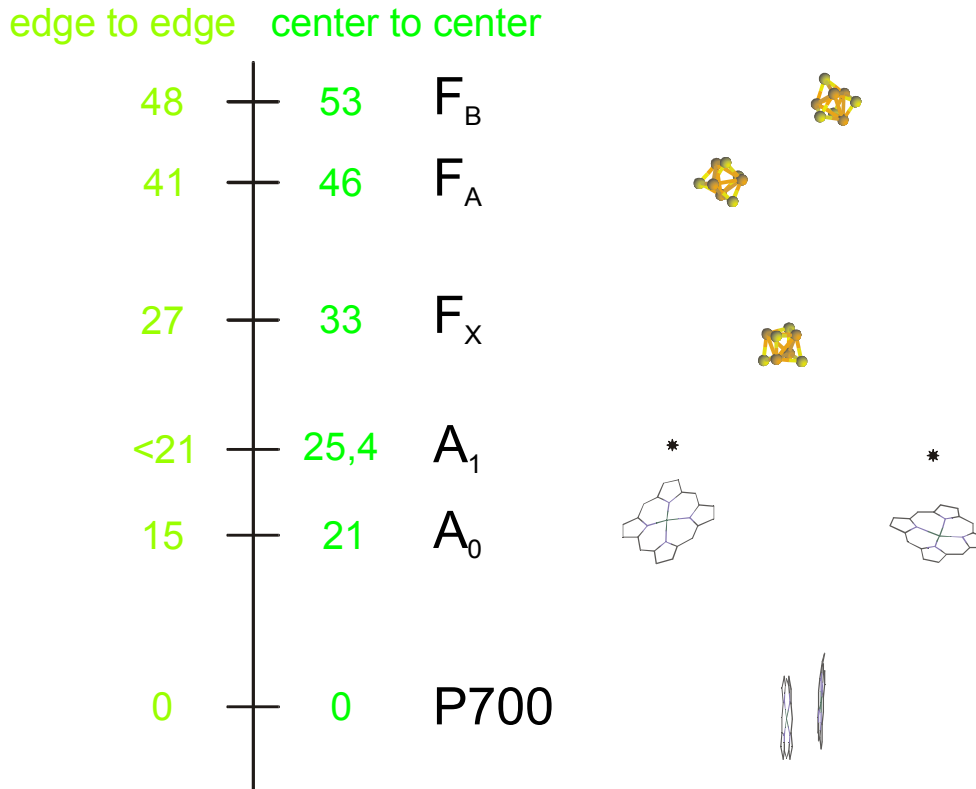


Abb. 6.9: "edge to edge" und "center to center" Abstände der Kofaktoren zum P700 [116,14,117]

Verbindung ca.  $0.7 \text{ \AA}^{-1}$ . Um  $|T_{DA}|^2$  für Proteine abschätzen zu können, haben Moser et al. [115] vernachlässigt, daß das Elektron bei seinem Transfer innerhalb eines Proteins Bereiche mit unterschiedlichen  $\beta$ -Werten durchwandert und das gesamte Protein als ein glasartiges Medium mit gleichem  $\beta$ -Wert betrachtet. Diese Näherung ist auch notwendig, da in der Regel die Strukturdaten der Proteine fehlen, um eine detaillierte Berechnung durchzuführen. Aus ihren Messungen an Reaktionszentren aus Purpurbakterien mit Abständen zwischen  $5 \text{ \AA}$  und  $22 \text{ \AA}$  haben Moser et al. ein einheitliches  $\beta$  mit  $1.4 \text{ \AA}^{-1}$  ermittelt. Dies würde bedeuten, daß  $|T_{DA}|^2$  mit einer Abstandvergrößerung von  $1.7 \text{ \AA}$  um eine Größenordnung abnimmt.

Der Franck-Condon Faktor (F.C.) gibt die Überlappung der Kernwellenfunktionen der Reaktanten ( $D^-A$ ) und Produkte ( $DA^-$ ) wieder. Die für den Franck-Condon Faktor von Marcus klassisch hergeleitete Abhängigkeit lautet:

$$(\text{F.C.}) = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda kT}} \exp\left[-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)}{4\lambda kT}\right], \quad \text{Gl. 6.9}$$

mit  $\Delta G^0$  als freie Standardreaktionsenthalpie und  $\lambda$  als Reorganisationsenergie.

Wie aus Abb. 6.10 ersichtlich, wird die vereinfachte Annahme gemacht, daß es sich für die Edukte und Produkte um die Potentiale eines harmonischen Oszillators handelt. Entsprechend den klassischen Vorstellungen kann es nur zu einem Elektronentransfer kommen, wenn es zu

einem Schnittpunkt des Potentials kommt. Dies kann durch thermische Schwingungen der Kerne erreicht werden. Die Reorganisationsenergie  $\lambda$  ist die Energie, die das System benötigt, um die räumlichen Änderungen der direkt am Elektronentransfer beteiligten Teilchen ( $\lambda_i$ ) und den Teilchen in deren Umgebung ( $\lambda_0$ ) für den Übergang  $D^+A \rightarrow DA^+$  zu bewirken.  $\lambda_0$  ist dabei meist der dominierende Anteil. Für sphärische Teilchen in einem homogenen Medium kann  $\lambda_0$  mit

$$\lambda_0 = e^2 \left( \frac{1}{2a_D} + \frac{1}{2a_A} - \frac{1}{r} \right) \left( \frac{1}{\epsilon_{op}} - \frac{1}{\epsilon_s} \right), \quad \text{Gl. 6.10}$$

berechnet werden. Hierbei ist  $e^-$  die Elementarladung,  $a_D$  und  $a_A$  die Radien des Donators und Akzeptors,  $r$  ihr "center to center"-Abstand und  $\epsilon_{op}$  und  $\epsilon_s$  die optische und statische Dielektrizitätskonstante des Mediums. Die Dielektrizitätskonstanten spielen eine große Rolle bei der Berechnung der Reorganisationsenergie.

Moser und Dutton [118] haben eine Vielzahl von Elektronentransferreaktionen in bakteriellen Reaktionszentren analysiert und gezeigt, daß folgende Näherungsformel verwendet werden kann:

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6r - \frac{3.1(\Delta G^0 + \lambda)^2}{\lambda}, \quad \text{Gl. 6.11}$$

wobei  $r$  als "edge to edge"-Abstand definiert ist.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ET}$  für die Rekombination von  $P700^+$  mit  $(F_A F_B)^-$  soll für den schnellsten Fall mit  $\lambda = -\Delta G^0$  abgeschätzt werden. Geht man von einem schnellen Gleichgewicht zwischen  $F_A^- F_B$  und  $F_A F_B^-$  aus, muß man für den günstigsten Fall den "edge to edge"-Abstand zwischen  $F_A$  und  $P700$  von 41 Å verwenden (siehe Abb. 6.9). Eine Berechnung mit Gl. 6.11 führt zu einer Halbwertszeit von  $2.76 \cdot 10^9$  s was ungefähr 87.5 Jahren entspricht. Dieser Wert ist so weit von den gefundenen 90 ms entfernt, daß eine direkte Rekombination ausgeschlossen werden kann.

Da die Gl. 6.11 auf dem von Moser et al. [118] empirisch gefundenen  $\beta$  mit einem Wert  $1.4 \text{ Å}^{-1}$  basiert, soll noch eine Abschätzung erfolgen, welchen Wert  $\beta$  annehmen muß, damit eine Halbwertszeit von 90 ms resultiert. Betrachtet man dazu die Gl. 6.8 erkennt man, daß das  $\beta$  als Faktor  $e^{-\beta r}$  in die Rekombinationsrate eingeht. Um also die Rekombinationsrate um das  $3.45 \cdot 10^{10}$ -fache schneller werden zu lassen, müßte sich das  $\beta$  in unserem Fall von  $1.4 \text{ Å}^{-1}$  auf  $0.8 \text{ Å}^{-1}$  verringern. Ein Wert, der in der Literatur für Elektronentransferschritte, die nicht über kovalente Bindungen sondern in Proteinen stattfinden, nie beschrieben wurde.

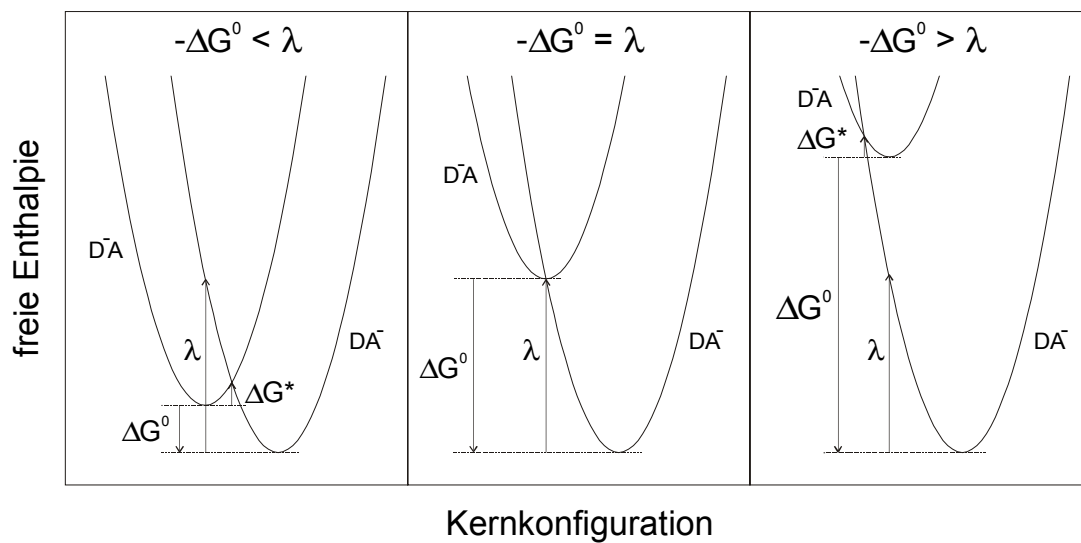


Abb. 6.10: Schematische Darstellung der Potentialkurven für Edukte und Produkte bei einer nicht adiabatischen Elektrontransferreaktion  $D^{\cdot-}A \rightarrow DA^{\cdot-}$ . Von links nach rechts sind die normale Region, der optimale Fall und die nach Marcus invertierte Region zu sehen.

## 7 Untersuchungen der Halbstufenpotentiale des primären Donators und deren Beeinflussungen durch Punktmutationen

### 7.1 Einleitung

In diesem Kapitel werden Bestimmungen des Halbstufenpotentials für die Oxidation von P700 im Photosystem I aus *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben. Durch Untersuchungen an Photosystem I-Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, bei denen die Aminosäuren Histidin-A676 in der Proteinuntereinheit PsaA und Histidin-B656 in der Untereinheit PsaB selektiv ausgetauscht wurden, soll der Einfluß der axialen Liganden auf das Halbstufenpotential des primären Elektronendonators P700 charakterisiert werden [119, 120].

Vergleichende Untersuchungen wurden auch am primären Donator des bakteriellen Reaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt [121].

### 7.2 Halbstufenpotential vom P700/P700<sup>+</sup> in *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii*

Zur Bestimmung der Halbstufenpotentiale wurde in der Probelösung das gewünschte Redoxpotential durch geeignete Zugabe von Ferri- und Ferrocyamid eingestellt. Anschließend wurde die blitzinduzierte Absorptionsänderung bei 826 nm gemessen, die der Oxidation von P700

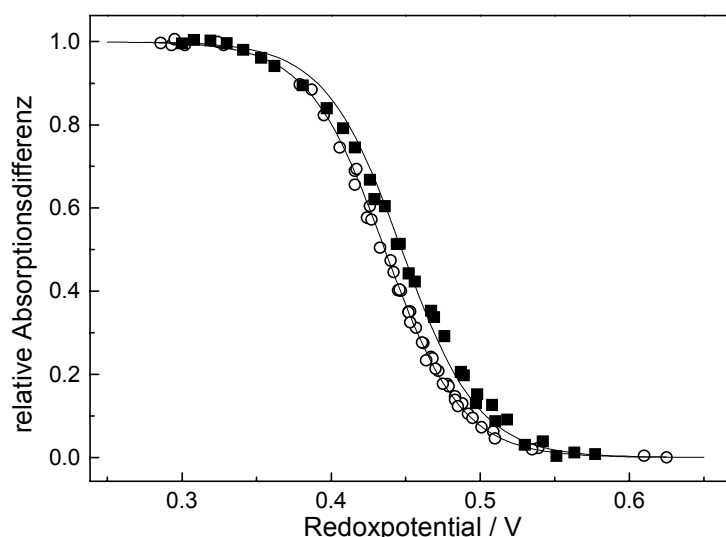


Abb. 7.1: Redox titration von P700/P700<sup>+</sup> aus *Synechococcus elongatus* (offene Kreise) und *Chlamydomonas reinhardtii* (geschlossene Quadrate). Die Zunahme der Absorptionsdifferenz bei 826 nm wird der Bildung von P700<sup>+</sup> zugeordnet. Die durchgezogenen Linien geben die beste Anpassung einer Nernstfunktion für eine Einelektronenreaktion wieder. Für *Synechococcus elongatus* resultiert ein  $E_m$  von  $(436 \pm 5)$  mV, für *Chlamydomonas reinhardtii* ein  $E_m$  von  $(447 \pm 8)$  mV.

zugeordnet wird. Die Größe der Anfangsamplitude spiegelt wieder, in welchem Umfang P700 bei dem eingestellten Potential bereits oxidiert vorliegt. Trägt man die Anfangsamplitude gegen das Redoxpotential auf, kann das Halbstufenpotential durch Anpassung einer Nernstfunktion ermittelt werden.

Abb. 7.1 zeigt die Redox titrationen der Wildtypen von *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii*. Aus der Anpassung der Nernstfunktion für eine Einelektronenreaktion resultiert für *Synechococcus elongatus* ein Halbstufenpotential von  $(436 \pm 5)$  mV und für *Chlamydomonas reinhardtii* ein Halbstufenpotential von  $(447 \pm 8)$  mV. Diese Ergebnisse stimmen im Rahmen des Fehlers gut überein, so daß von keinem Unterschied der Halbstufenpotentiale von  $P700/P700^+$  zwischen den beiden Spezies gesprochen werden kann.

Das Halbstufenpotential des Redoxpaares  $P700^+/P700$  ist wesentlich negativer, als das Halbstufenpotential für Chl *a* in organischen Lösungsmitteln ( $E_m \approx 700$  mV bis 900 mV) [122].

Im folgenden wurden Mutanten untersucht, bei denen die Histidine durch unpolare, polare, ungeladene, saure und basische Aminosäuren substituiert wurden (Gly, Ser, Cys, Asn, Gln, Leu, Phe, Asp und Arg). Für diese Mutanten wurden ebenfalls die Halbstufenpotentiale von  $P700/P700^+$  bestimmt (siehe Abb. 7.2).

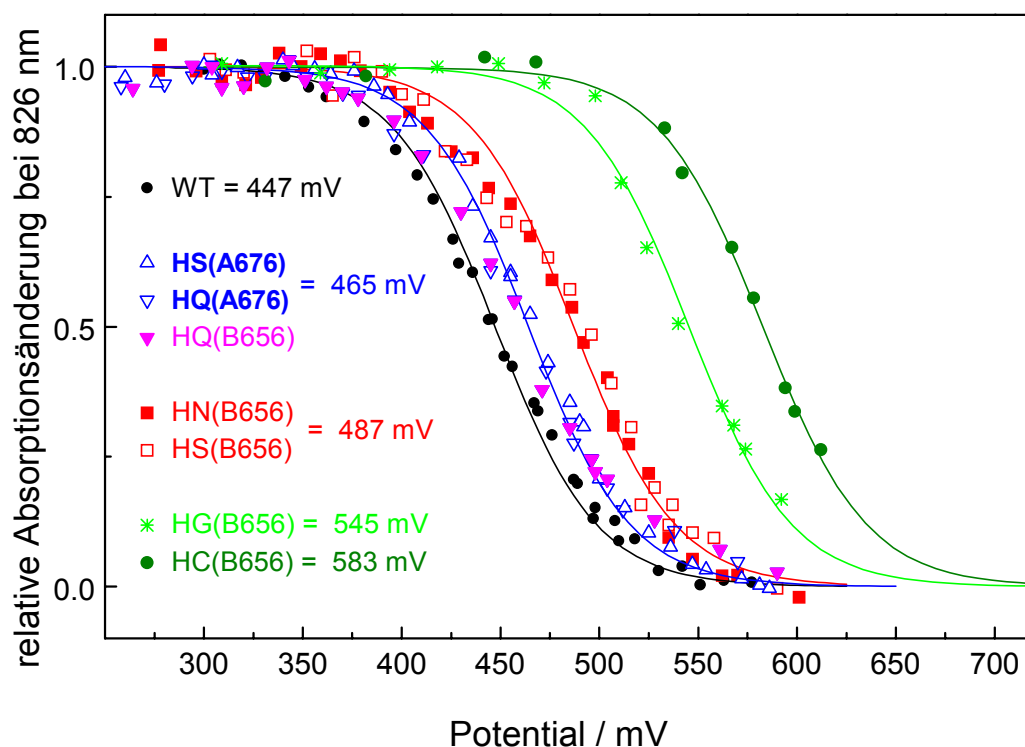


Abb. 7.2: Redox titration von  $P700/P700^+$  aus *Chlamydomonas reinhardtii*-Mutanten. Die Zunahme der Absorptionsdifferenz bei 826 nm wird der Bildung von  $P700^+$  zugeordnet. Die durchgezogenen Linien geben die beste Anpassung einer Nernstfunktion für eine Einelektronenreaktion wieder. Der Fehler beträgt für alle Messungen  $\pm 6$  mV.

Für die HQ(A676), HS(A676) und HQ(B656) wurde eine Verschiebung des Redoxpotentials um +20 mV gefunden, für die HN(B656) und HS(B656) eine Verschiebung um +40 mV. Eine starke Verschiebung zu positiveren Halbstufenpotentialen zeigen die Mutanten HG(B656) und HC(B656) mit 100 mV und 140 mV.

Die verschiedenen Mutationen auf der PsaB-Untereinheit haben einen unterschiedlich starken Einfluß auf das Halbstufenpotential des primären Donators. Glutamin stabilisiert das P700-Kation durch das einsame Elektronenpaar am Sauerstoff ähnlich gut wie der Stickstoff im Histidin. Daher kommt es nur zu einer geringen Erhöhung des Halbstufenpotentials. Asparagin hat zwar dieselbe funktionelle Gruppe, die Kohlenstoffkette ist jedoch ein Glied kürzer, so daß die Stabilisierung nicht so effizient ist. Dadurch steigt das Halbstufenpotential stärker als bei der Gln-Mutante. Entsprechend ist die Verschiebung bei der Ser-Mutante, da auch diese über eine polare Hydroxylgruppe etwa im selben Abstand verfügt. Einen stärkeren Effekt hat das unpolare Glycin, das zudem noch weiter vom primären Donator entfernt ist. Hier kommt es zu der beobachteten Verschiebung von +100 mV. Die noch größere Verschiebung von +140 mV beim Cystein ist bisher nicht verstanden. Auch ist der Protonierungszustand nicht geklärt. Es wird vermutet, daß sich die gesamte Proteinstruktur in der Umgebung der Aminosäure verändern könnte.

Bei den Mutationen auf der PsaA-Untereinheit kommt es nur zu einer geringen Verschiebung des Redoxpotentials um max. +20 mV. Dies legt die Vermutung nahe, daß die positive Ladung sich überwiegend auf der PsaB-Seite befindet und die Veränderung der komplexierenden Aminosäuren des P700<sub>B</sub> so einen stärkeren Einfluß hat.

Die Auswirkungen der Substitutionen von His(A676) und His(B656) auf das Halbstufenpotential von P700 zeigen, daß die mutierten Positionen im Proteingerüst des PS I in unmittelbarer Nachbarschaft zum primären Elektronendonator sein müssen. Der Einfluß auf die biophysikalischen Eigenschaften des P700 läßt sich auch mit optischer und ENDOR-Spektroskopie zeigen [119, 120]. Die Bildung eines Heterodimers (Chl *a*/Pheo *a*), wie es bei bakteriellen Reaktionszentren möglich ist (siehe Kapitel 7.3), konnte nicht beobachtet werden. Dies ist maßgeblich darauf zurückzuführen, daß die analogen Substitutionen in *Chlamydomonas reinhardtii* zu Phänotypen führen, die nicht ausreichend PS I akkumulieren. Die Charakterisierung von mutierten PS I-Komplexen, die kleine oder polare Aminosäuren anstelle von His(A676) oder His(B656) enthalten, ergeben in Bezug auf die beobachteten Effekte eine große Übereinstimmung mit homologen Mutationen in bRC (siehe Kapitel 7.3).

Aus den experimentellen Ergebnissen der elektrochemischen und spektralen Untersuchungen wird der Schluß gezogen, daß P700 durch His(B656) axial ligandiert wird. Für die Substitutionen von His(A676) ist wegen der vergleichsweise geringen Auswirkungen auf die Eigenschaften von P700 diese Zuordnung nicht eindeutig zu erkennen. Aufgrund der sehr hohen Homologie in der Aminosäuresequenz von PsaA und PsaB und aufgrund des symmetrischen Aufbaus dieser Proteinuntereinheiten im PS I-Komplex [123] ist jedoch davon auszugehen, daß His(A676) das Chlorophyllmolekül P700<sub>A</sub> axial ligandiert.

### 7.3 Halbstufenpotential vom P/P<sup>+</sup> in *Rhodobacter sphaeroides*

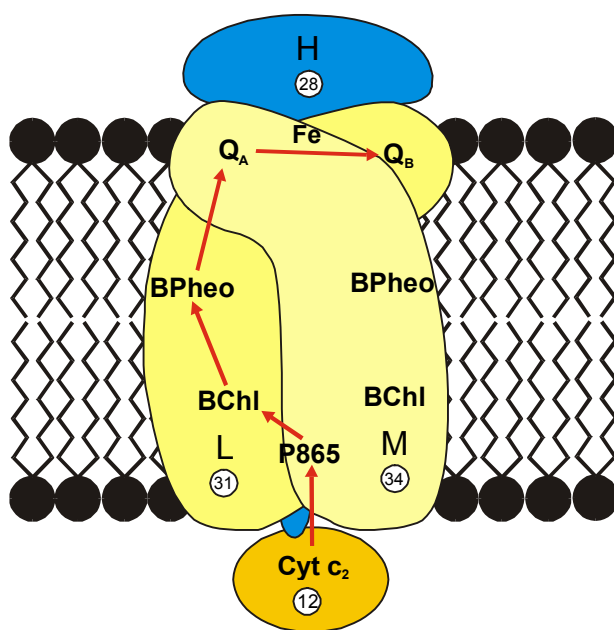


Abb. 7.3: Schema des bakteriellen Reaktionszentrums

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß der axialen Liganden auf das Halbstufenpotential des primären Donators wurden am bakteriellen Reaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt. In diesem Fall wurde das Histidin an der Position 202 in der M-Untereinheit, das als axialer Ligand eines der beiden Bakteriochlorophylle des primären Elektronendonators P865 dient, durch die Aminosäuren Glutaminsäure (Glu), Asparagin (Asn) oder Serin (Ser) substituiert. Frühere Arbeiten haben bereits die Substitution durch Leucin (Leu) [124] und

Glycin (Gly) [125] behandelt. Anschließend wurde der Einfluß der Mutanten auf das Absorptionsdifferenzspektrum und das Halbstufenpotential des Paares P865/P865<sup>+</sup> untersucht.

Prinzipiell kann auch bei den bakteriellen Reaktionszentren das Halbstufenpotential mit der unter Kapitel 7.2 beschriebenen Methode gemessen werden. Zu beachten ist, daß mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln keine sättigende Anregung der Probe erreicht werden kann. Dies hat zur Folge, daß alle die Anregung betreffenden Faktoren über die gesamte Messung hinweg streng konstant gehalten werden müssen. Da die zur Einstellung des Redoxpotentials verwendeten Salze K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] und K<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] im blauen Wellenlängenbereich absorbieren und sich die Konzentrationen der Salze zwangsläufig ändern, wird das Anregungslicht



durch ein Interferenzfilter (AL 804) eingestrahlt, da es hier zu keiner Absorption des Redoxpaares kommt. Durch Aufzeichnung der Transmissionsspektren wurden dann die Interferenzfilter IL 876 vor und AL 883 nach der Probe ausgewählt, da das IL 876 vollständig innerhalb des Transmissionsspektrums vom AL 883 liegt und beide kaum eine Überlappung mit dem Transmissionsspektrum des AL 804 zeigen. Das Meßlicht um 880 nm zu wählen, hat den Vorteil einer hohen Selektivität. Da die Probe durch das Meßlicht angeregt wird, mußte unter geringen Meßlichtintensitäten gemessen werden.

Neben den Mutanten, deren Halbstufenpotentiale im einstellbaren Bereich mit Ferri- und Ferrocyanid bestimmt werden konnten, lag das Halbstufenpotential der HE(M202)-Mutante so positiv, daß diese Methode nicht mehr angewendet werden konnte. Diese Probe machte es notwendig, die bereits in der Literatur beschriebene Otle-Zelle [126] aufzubauen. Da sich Absorptionsdifferenzmessungen mit der Otle-Zelle aufgrund ihrer Geometrie nicht durchführen lassen, wird die potentiostatische Titration am Absorptionsspektrum verfolgt. Eine Methode, die bei bakteriellen Reaktionszentren aufgrund der fehlenden Antennenbakteriochlorophylle verwendet werden kann.

Abb. 7.4 zeigt das Ergebnis einer Redox Titration in einer Otle-Zelle für die Mutante HN(M202). Da Testmessungen ergeben haben, daß die Probe bei positiven Potentialen über 500 mV Zersetzungserscheinungen zeigt, wird zuerst von großen zu kleinen Werten titriert (■) und anschließend von kleinen zu großen (●).

Die unterschiedlichen Amplituden der Absorptionsänderung zu Beginn und am Ende der Titration können darauf zurückzuführen sein, daß ein Teil der Reaktionszentren irreversible zerstört worden ist. Dadurch würde freies Bakteriochlorophyll entstehen. Diese kann aufgrund seines positiveren Halbstufenpotentials in dem untersuchten Potentialbereich nicht mehr oxidiert werden und trägt damit nicht mehr zur Absorptionsänderung bei.

Die mit den beiden Methoden gefundenen Halbstufenpotentiale betragen:

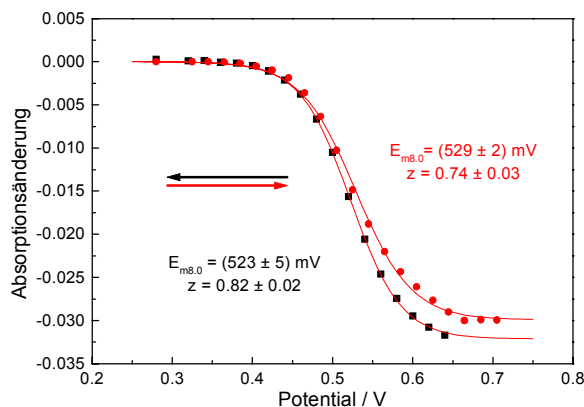


Abb. 7.4: Bestimmung des Halbstufenpotentials der HN(M202)-Mutante von *Rhodospirillum rubrum* mit Hilfe der Otle-Zelle. Die durchgezogenen Linien zeigen Nernstkurven, die durch Fitten an die Meßpunkte angepaßt wurden. ■ zeigt die Messung von großen zu kleinen Werten, ● die Messung in umgekehrter Richtung

Mutante	WT	HS	HG	HN	HE
$E_{m8.0} / \text{mV}$	$504 \pm 5$	$520 \pm 7$	$508 \pm 6$	$525 \pm 6$	$673 \pm 14$

ENDOR-Spektren zeigen für die HS- und HG-Mutante eine nur wenig unterschiedliche Spindichtevertellung, was eindeutig darauf hinweist, daß das natürliche Homodimer (BChl/BChl) erhalten bleibt. Dafür sprechen auch die vom WT wenig abweichenden Halbstufenpotentiale. Da eine direkte Komplexierung des Magnesium aufgrund der kurzen Seitenkette von Glycin und Serin nicht möglich ist, aber ein genügend großer Zwischenraum für ein Wassermolekül geschaffen wird, geht man für beide Mutanten von einer Ligandierung über ein eingelagertes Wassermolekül aus.

Für die HN-Mutante liegen keine ENDOR-Messungen vor. Aufgrund des Halbstufenpotentials und der Struktur des Asparagin ist es aber auch bei dieser Mutante am wahrscheinlichsten, daß das P865 als Homodimer vorliegt. Die Länge der Seitenkette der HN-Mutante würde im Gegensatz zur HS- und HG-Mutante eine direkte Ligandierung des Magnesium ermöglichen.

Für die HE-Mutante weisen mehrere Aspekte darauf hin, daß der primäre Donator ein Heterodimer (BChl/BPheo) ist. Zum einen liegt das sehr positive Redoxpotential der HE-Mutante mit  $(673 \pm 14) \text{ mV}$  ähnlich hoch, wie bei der aus der Literatur bekannten HL(M202)-Mutante ( $(640 \pm 10) \text{ mV}$  [127]), zum anderen konnte mit ENDOR-Spektroskopie gezeigt werden, daß das ungepaarte Elektron nur auf dem L-seitig koordinierten BChl vom primären Donator P865 lokalisiert ist. Außerdem zeigen lichtinduzierte FTIR-Differenz-Spektren nicht die für das Homodimer typischen IR-Banden bei  $2650 \text{ cm}^{-1}$  bis  $2750 \text{ cm}^{-1}$  für elektronische Übergänge im NIR [128].

Die Bildung des Heterodimers wird wie folgt erklärt. Die durch Mutation eingefügte Glutaminsäure an der Position M202 ist aufgrund ihrer Größe kaum in der Lage, daß Magnesium zu ligandieren. Zudem ist der Freiraum auf der M-Seite zu klein, damit sich ein Wassermolekül wie z.B. bei der HG-Mutante einlagern kann. Da so der fünfte Ligand für das Magnesium fehlt, wird das BChl destabilisiert und bildet unter Verlust des Zentralatoms ein BPheo.

## 8 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinen Systemen

### 8.1 Einleitung

Von größtem Interesse ist es, eine möglichst detaillierte Kenntnis über die Struktur der untersuchten Systeme zu erhalten. Da dies am besten durch Röntgenstrukturanalyse am Kristall möglich ist, ist es von Bedeutung, möglichst große Einkristalle des zu untersuchenden Proteins zu züchten, bei denen die im Kristallgitter fixierten Proteine dem nativen Zustand entsprechen sollen. Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen, ist es, spezifische Aktivitätsuntersuchungen an dem Kristall durchzuführen und mit den als nativ angenommenen Ergebnissen aus Messungen in Lösung zu vergleichen. Im Folgenden wurden solche Aktivitätsmessungen für kristallines PS I und PS II durchgeführt.

### 8.2 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinem PS I

Für die röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden Kokristalle von Photosystem I mit seinem natürlichem Elektronenakzeptor Ferredoxin gezüchtet [129]. An diesen Kristallen wurde durch Messungen am Synchrotron ein Teildatensatz mit einer Auflösung bis zu 7 Å gesammelt. Um sicherzustellen, dass die Funktionalität des Reaktionszentrums im Kristall noch gegeben ist, wurde die Reduktion des Ferredoxins durch Belichtung mit Hilfe der EPR nachgewiesen. Zusätzlich sollte optisch untersucht werden, ob das P700 oxidiert und anschließend durch einen künstlichen Donator wieder vollständig rereduziert werden kann.

Der Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung des PS I-Kristalls wurde bei 830 nm in einem Absorptionsphotometer entsprechend der Arbeit [130] gemessen. Als Meßlichtquelle diente eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 830 nm, die anders als sonst üblich, auf den Kristall fokussiert wurde. Um den nach dem Kristall aufgeweiteten Meßlichtstrahl gut detektieren zu können, wurde eine großflächige Photodiode (SGD 444, EG&G), die mit einem Farbkantenfilter (RG780, Schott) und einem Interferenzfilter (AL 829, Schott) vor Fremd- und Fluoreszenzlicht geschützt wurde, verwendet. Das verstärkte Ausgangssignal der Photodiode wird mit einem Transientenrekorder (TDS 540, Tektronix) aufgezeichnet. Die Anregung der Probe erfolgt mit einem frequenzverdoppelten, gütegeschalteten Nd:YAG Laser bei 532 nm (Quantel), der eine Halbwertsbreite von 3 ns besitzt.

Der Kristall wurde in einer scheibenförmigen Küvette mit einer optischen Weglänge von 1 mm fixiert. Als Pufferlösung wurde 0.1 M HEPES mit pH = 7.5 verwendet, der zusätzlich 0.15 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02 %  $\beta$ -DM und 20 % PEG 400 enthält. Als künstliche Elektronendonatoren wurden 15 mM Ascorbat und 50  $\mu$ M PMS hinzugefügt.

Wie die Abb. 8.1 zeigt, verhält sich der Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 830 nm von kristallisierten PS I analog zu den bekannten Messungen an gelöstem PS I.

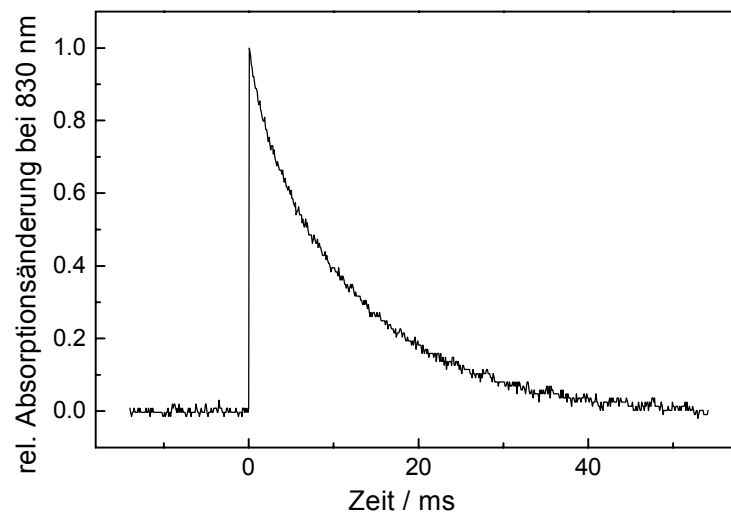


Abb. 8.1: Zeitlicher Verlauf der blitzinduzierten Absorptionsänderung bei 830 nm von kristallisierten trimeren PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus*  
Meßbedingungen:

Einkristall, 0.5 mm x 0.5 mm x (0.1 mm - 0.2 mm)

15 mM Ascorbat, 50  $\mu$ M PMS

Puffer: 10 % PEG 400, 0.1 M HEPES pH = 7.5, 0.15 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02 %  $\beta$ -DM

### 8.3 Aktivitätsuntersuchungen an kristallinen PS II

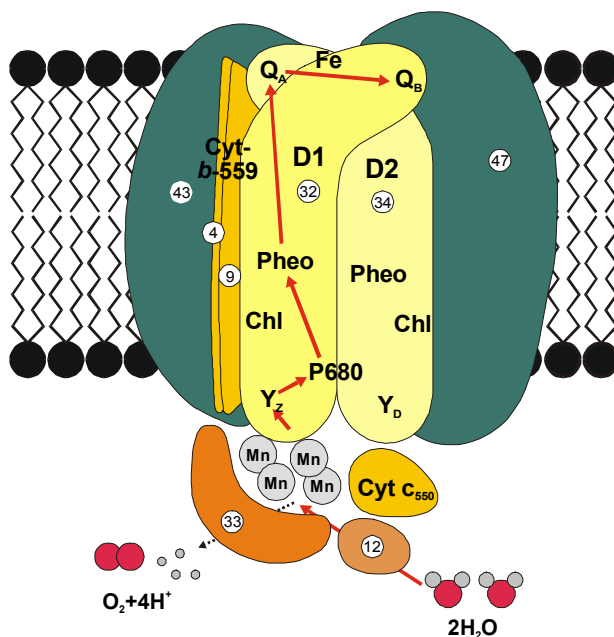


Abb. 8.2: Schema des PS II

Zur röntgenspektroskopischen Untersuchung der Struktur des Photosystems II werden Kristalle im mm-Maßstab benötigt. Diese dreidimensionalen Kristalle werden aus dimeren PS II "core"-Komplexen, die aus *Synechococcus elongatus* isoliert werden, gezüchtet. Da es bei dem Einbau der "core"-Komplexe in das Kristallgitter zu signifikanten Deformationen der Proteinstruktur kommen kann, sollte die Sauerstoffentwicklung und Protonenfreisetzung an den Kristallen überprüft werden [131]. Weiterhin war von Interesse, wie

stabil die Kristalle sind und mit welchen Hydroxylaminkonzentrationen man in welcher Zeit möglichst schonend den Mangancuster aus dem Photosystem II entfernen kann.

Die Sauerstoffaktivität wurde direkt am Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Probelösung in Abhängigkeit der eingestrahlten Blitze gemessen (Abb. 8.3). Sie ergab  $1/4 \text{ O}_2/(66 \text{ Chl} \cdot \text{Blitz})$ . Für die Messungen wurde eine Suspension von Mikrokristallen mit einer Kantenlänge unter 0.1 mm verwendet, um trotz der hohen optischen Dichte noch eine sättigende Anregung zu gewährleisten. Um in dem isolierten Photosystem die Reoxidation der Chinone zu gewährleisten, wurden 1 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor und 100  $\mu\text{M}$  DCBQ als Mediator verwendet.

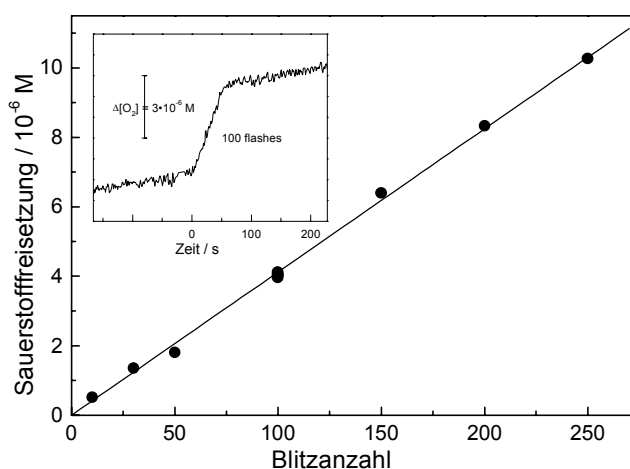


Abb. 8.3: Sauerstoffentwicklung von PS II Kristallen bei 20°C als Funktion der Anzahl der Anregungsblitze. Der Anstieg und die Chlorophyllkonzentration von 11.4  $\mu\text{M}$  ergeben eine Aktivität von  $1/4 \text{ O}_2/(66 \text{ Chl} \cdot \text{Blitz})$ . Das eingefügte Bild zeigt das Signal-/Rauschverhältnis der Messung über einen Zeitraum von 100 Blitzen.

Für die Stabilitätsmessungen wurde die relative Sauerstoffaktivität durch die Messung der Sauerstoffentwicklung bei Belichtung mit Sequenzen von 100 Blitzen als Funktion der Gesamtblitzzahl bestimmt. Insgesamt wurden 10000 Blitze auf die Probe eingestrahlt. Als Referenz wurde die Messung mit einer flüssigen Probe, die als Ausgangslösung für die Kristallisation verwendet wird, wiederholt. Damit es über die hohe Blitzanzahl nicht zu einer Verarmung des Akzeptors  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  kommt, wurde entsprechend des Verbrauches Ferricyanid nachgegeben. Abb. 8.4 zeigt die hohe Stabilität der im Kristall eingebetteten PS II "core"-Komplexe, die in ihrer Sauerstoffaktivität mit 10000 Blitzen nur 30 % abgenommen haben. Die Vergleichsmessung an den gelösten "core"-Komplexen zeigt hingegen nach 10000 Blitzen bereits eine Abnahme um 45 %.

Zur Aufklärung der Kristallstruktur werden isomorphe Ersetzungen von Schwermetall-Komponenten benötigt, um den Phasenwinkel der Röntgenbeugung zur Berechnung der Elektronendichte zu erhalten. Dazu werden vergleichende Röntgenbeugungen an PS II-Komplexen mit und ohne Mangankomplex gemessen. Der Mangankomplex wurde mit Hilfe von Hydroxylamin aus dem PS II herausgelöst. Ziel war es, eine möglichst geringe

Hydroxylaminkonzentration zu finden, die in kurzer, aber reproduzierbarer Inkubationszeit (ca. 1 h) den Mangankomplex weitestgehend abtrennt. Dieser Wert wurde mit Reihenuntersuchungen von Hydroxylaminkonzentrationen zwischen 25  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  und Inkubationszeiten zwischen 5 min und 120 min näherungsweise bestimmt. Als Index wurde abermals die relative Sauerstoffaktivität verwendet, die jeweils vor der Inkubation und nach dem Herauswaschen des Hydroxylamins nach dem Inkubieren bestimmt wurde. Ein gutes Ergebnis liefert eine 80-minütige Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Hydroxylamin im Dunkeln.

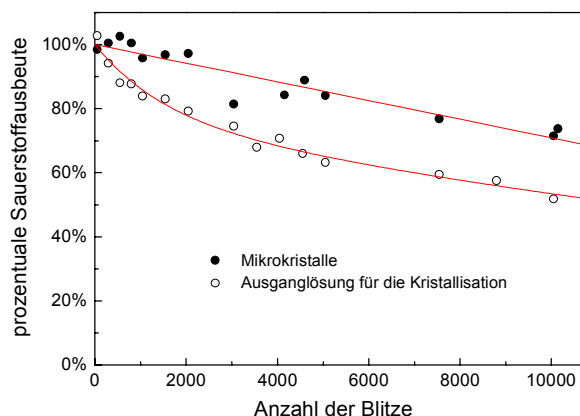


Abb. 8.4: Stabilität der PS II Kristalle (○) und der Kristallisationslösung (●) bei 20°C charakterisiert durch die relative Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit der Blitzzahl

Die Kristalle zeigen mit  $1/4 \text{ O}_2/(66 \text{ Chl-Blitz})$  eine unverändert gute Sauerstoffaktivität gegenüber PS II-Komplexen in wässriger Lösung und sie haben zusätzlich eine höhere Stabilität gegenüber Belichtungsstreß. Aus anderen Messungen an den Mikrokristallen geht hervor, daß die Protonenfreisetzung  $1 \text{ H}^+/(67 \text{ Chl-Blitz})$  beträgt [131]. Diese Protonenaktivität hat ebenfalls annähernd den selben Wert, wie der von PS II-Komplexen in wässriger Lösung. Das Verhältnis der Freisetzung von Protonen und Sauerstoffmolekülen in den Kristallen entspricht mit  $\text{H}^+/\text{O}_2 \approx 4$  der Stöchiometrie, die für die Wasserspaltung erwartet wird.

Diese Ergebnisse liefern den Nachweis, daß die verwendeten Kristalle geeignet sind, Röntgenstrukturanalysen am funktionell intakten Wasserspaltungskomplex durchzuführen.

Das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse liefert die Struktur mit einer Auflösung von 3.8 Å [132].

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kenntnis der energetischen Organisation der Kofaktoren im Photosystem I und der Kinetiken beim Elektronentransfer sind essentielle Grundlagen zum Verständnis des Prozesses der Photosynthese. In der Vergangenheit wurden daher zahlreiche Forschungsarbeiten durchgeführt, um diese Daten zu erhalten. Teilweise liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor, sie sind widersprüchlich oder die Untersuchungsmethoden geben Anlaß zum Zweifel, daß die Ergebnisse die gestellten Fragen beantworten können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ladungsrekombination zwischen dem oxidierten Elektrodendonator,  $P700^+$ , und den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren,  $(F_A F_B)^-$  bzw.  $(F_A^- F_B^-)$ , untersucht. Dabei gliedert sich die Arbeit in drei Abschnitte:

- Halbwertszeiten der Rekombinationskinetiken
- Halbstufenpotentiale für die einfache und doppelte Reduktion von  $(F_A F_B)$
- Aktivierungsenergie für die Rekombination von  $P700^+(F_A F_B)^-$

Die Halbwertszeit für die reine Rekombinationsreaktion des Zustandes  $P700^+(F_A F_B)^-$  oder  $P700^+(F_A^- F_B^-)$  ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Zu den Halbstufenpotentialen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, deren Ergebnisse voneinander abweichen und deren Meßmethoden systematische Fehler vermuten lassen. Die Aktivierungsenergie wurde in zwei Arbeiten bestimmt, deren Daten sich jedoch so sehr unterscheiden, daß die Ergebnisse nicht dem selben Prozeß zugeordnet werden können.

In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich das thermophile Bakterium *Synechococcus elongatus* untersucht. Als Methode wurde überwiegend die blitzinduzierte Absorptionsdifferenzspektroskopie eingesetzt; Redox titrationen wurden zusätzlich mit Hilfe der EPR durchgeführt.

Unterschiedliche Methoden wurden angewandt, um die Kinetik der Ladungsrekombination zwischen  $P700^+$  und  $(F_A F_B)^-$  zu analysieren. Die Untersuchungen wurden dadurch erschwert, daß in Konkurrenz zur Rekombination ein Vorwärtselektronentransfer von den reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren zu einem unbekannten Akzeptor erfolgt. Es konnte gezeigt werden, daß Sauerstoff maximal 40% dieses Akzeptors ausmacht. Da der unter anaeroben Bedingungen verbleibende Akzeptor nicht charakterisiert oder entfernt werden konnte, wurde er durch gezielte Zugabe von Dithionit bei einem Potential von -250 mV reduziert, damit er keine

Elektronen mehr aufnehmen kann. Unter diesen Bedingungen wurde eine Halbwertszeit für die Rekombination von 85 ms bestimmt. Diese stimmt gut mit der durch Berechnung des Zeitverlaufes der Absorptionsänderung in Gegenwart von Akzeptoren und Donatoren erhaltenen Halbwertszeit von 100 ms überein. Das Mittel über alle Messungen ergibt eine Halbwertszeit von  $(95 \pm 10)$  ms. Eine Verringerung des Redoxpotentials führt zur einfachen Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren, so daß nach Blitzlichtanregung die Rekombination zwischen  $P700^+$  und  $(F_A^- F_B^-)$  mit einer Halbwertszeit von  $(10 \pm 3)$  ms beobachtet werden kann. Werden die Eisen-Schwefel-Zentren bei ca. -590 mV doppelt reduziert, erfolgt nach Blitzlichtanregung die Rekombination von  $P700^+(A_1F_X)^-$  ( $F_A^- F_B^-$ ) mit einer Halbwertszeit von  $(275 \pm 25)$   $\mu$ s.

Um die Energetik der Reaktion zu bestimmen, wurden die Halbstufenpotentiale für die Oxidation des primären Elektronendonators und für die Reduktion der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren gemessen. Aus den Messungen an PS I-Komplexen aus *Synechococcus elongatus* und *Chlamydomonas reinhardtii* folgt ein Halbstufenpotential von  $(440 \pm 10)$  mV für die Oxidation von P700. Untersuchungen an PS I-Mutanten von *Chlamydomonas reinhardtii*, bei denen die axialen Liganden Histidin A676 und Histidin B656 durch verschiedene Aminosäuren substituiert wurden, haben gezeigt, daß das Halbstufenpotential sich um bis zu +140 mV verschiebt.

Um das Halbstufenpotential für die einfache und doppelte Reduktion der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren exakt bestimmen zu können, mußte ein Weg gefunden werden, das Redoxpotential exakt einzustellen, ohne dabei Mediatoren/Redoxpuffer zu verwenden, die gleichzeitig auch als Akzeptoren bzw. Donatoren fungieren würden und damit die beobachteten Kinetiken verfälschen. Hier hat es sich als praktikabel erwiesen den negativsten Wert zu verwenden, der sich in wäßrigen Lösungen in Abhängigkeit des pH-Wertes mit Dithionit einstellt. Anhand einer empirisch gefundenen Kalibrierkurve kann das jeweilige Potential als Funktion des pH-Wertes abgelesen werden. Diese Methode eignet sich beim Photosystem I, da es über einen weiten pH-Bereich (pH = 4.0 bis pH = 10.5) stabil ist. Zudem wirkt Dithionit nur sehr schlecht als Donator, bzw. seine Zerfallsprodukte als Akzeptor.

Analysiert man die Beiträge der oben genannten Ladungsrekombinationsreaktionen zu der blitzinduzierten Absorptionsänderung in Abhängigkeit des Redoxpotentials, erhält man die Halbstufenpotentiale für die ein- und zweifache Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren,



$(F_A F_B)/(F_A F_B)^{\cdot-}$  und  $(F_A F_B)^{\cdot-}/F_A^{\cdot-} F_B^{\cdot-}$ , mit  $(-440 \pm 10)$  mV und  $(-465 \pm 10)$  mV. Diese Ergebnisse zeigen in einem qualitativen Vergleich mit den potentialabhängigen EPR-Spektren eine gute Übereinstimmung.

Bei der Bestimmung der Aktivierungsenergie hat sich das Problem ergeben, daß alle bekannten und für die optische Spektroskopie notwendigen Gefrierschutzmittel einen störenden Einfluß auf das PS I haben und deshalb nicht für die Messungen unter dem Gefrierpunkt verwendet werden konnten. Die Ergebnisse beziehen sich daher nur auf den Temperaturbereich oberhalb von 0 °C und unterhalb der Denaturierungstemperatur von 40 °C. Die Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Rekombination zwischen  $P700^+$  und  $(F_A F_B)^{\cdot-}$  ergibt so  $(220 \pm 10)$  meV und eine maximale Rate von  $(44 \pm 10) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ .

Anhand der erhaltenen Ergebnisse erfolgt eine Zuordnung, auf welchem Wege der Zustand  $P700^+(F_A F_B)^{\cdot-}$  rekombiniert. Sowohl die direkte Rekombination, als auch die Rekombination über das  $F_X$  sind aufgrund des großen Abstandes der Eisen-Schwefel-Zentren zum  $P700^+$  und der daraus resultierenden sehr langsamen Ratenkonstanten für die Rekombination auszuschließen. Die Rekombination über den Zustand  $P700^+ A_0^{\cdot-}$  ist aufgrund der zu geringen Aktivierungsenergie nicht möglich. Nimmt man den Zustand  $P700^+ A_1^{\cdot-}$  als Zwischenstufe an, stimmen die ermittelte Energetik und Kinetik der Rekombination zwischen  $P700^+$  und  $(F_A F_B)^{\cdot-}$  gut mit den aus der Literatur bekannten Daten überein.

Abschließend werden Untersuchungen zur Aktivität von kristallisierten Photosystemen beschrieben. Diese haben gezeigt, daß die Aktivität von kristallisiertem PS I und PS II mindestens so hoch ist wie bei gelösten Komplexen. Zusätzlich wurde im PS II die Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Blitzzahl für bis zu 10000 Blitze bestimmt. Daraus hat sich ergeben, daß kristallines PS II stabiler ist als PS II-Komplexe in Lösung.

## Ausblick

Die Energetik und Kinetik im Photosystem I ist weitestgehend aufgeklärt. Es fehlt jedoch noch die zeitliche Auflösung des Elektronentransferschrittes von  $F_A^{\cdot-}$  auf das  $F_B$ , der aufgrund der spektralen Ähnlichkeit von  $F_A$  und  $F_B$  noch nicht gemessen werden konnte. Hierfür eine Möglichkeit zu finden würde das letzte Glied in der Kette schließen. Darüber hinaus gilt es nur noch ein paar Unstimmigkeiten in der Literatur betreffend der einzelnen Teilschritte im

Photosystem I nachzugehen und zu klären, ob bei den Messungen ein systematischer Fehler vorlag oder die unterschiedlichen Ergebnisse durch die verschiedenen verwendeten Spezies hervorgerufen werden.

Aus meiner Arbeit ergeben sich noch einige Fragen, die nicht für die gefundenen Ergebnisse relevant sind, aber die umgangenen Probleme betreffen. Zum Beispiel stellt sich die Frage, welcher externe Akzeptor unter anaeroben Bedingungen die Elektronen vom  $F_B^-$  abgreift. Sollte es sich wider Erwarten um eine interne Komponente handeln, wäre es möglich dies durch Punktmutationen der redoxaktiven Aminosäuren in der Nähe der terminalen Eisen-Schwefel-Zentren zu untersuchen. Auch die Frage, in welcher Art und Weise die verwendeten Gefrierschutzmittel das Photosystem I beeinflussen, bleibt offen.

Es sollte weiterhin versucht werden, die EPR-Spektren bei unterschiedlichen Potentialen mit einer vergleichbaren Intensität aufzunehmen und so eine quantitative Bestimmung der Halbstufenpotentiale zu ermöglichen.

## 10 Verzeichnis der Abkürzungen

4Fe-4S	Eisen-Schwefel-Zentrum vom Cuban-Typ [Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ]
A	Absorption
A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub>	primärer, sekundärer Akzeptor im PS I
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll
BPheo	Bakteriopheophytin
β-DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
bRC	bakterielles Reaktionszentrum
BV	Benzylviologen
Caps	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
Car	Karotinoid
Chl	Chlorophyll, Chlorophylle
[Chl]	Chlorophyll-Konzentration
Cyt	Cytochrom
d	optische Weglänge
DAD	2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylendiamin
DCBQ	2,5-Dichloro-p-Benzochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DTE	1,4-Dithioerythritol
ΔA	Absorptionsänderung
EPR,ESR	Elektronenspinresonanz
ENDOR	electron nuclear double resonance
F <sub>X</sub> , F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub>	Eisen-Schwefel-Zentren im PS I
Fd	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel-Zentren
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
kDa	Kilodalton
Mes	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MV	Methylviologen
MVI	Max-Volmer-Institut der TU Berlin
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
P	primärer Elektronendonator
P680, P700, P865	primäre Donatoren im PS II, PS I und bRC
Pheo	Pheophytin
Pipes	Piperazin-1,4-diethansulfonsäure
PMS	N-Methyl-phenazonium methylsulfat
PS	Photosystem
PsaA, PsaB, PsaC	Untereinheiten von PS I die Kofaktoren tragen
RC	Reaktionszentrum
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TPMD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
Tricine	N-Tris (hydroxymethyl) methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X	unbekannter Elektronenakzeptor im PS I
WT	Wildtyp

## 11 Literaturverzeichnis

- [1] Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Demeter, S. und Krasnovsky, A.A. (1979) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 249, 227-230
- [2] Voet, D. und Voet, J.G. (1992) In *Biochemie* Kapitel 22, 586-618, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- [3] Bisuputra, T. (1974) In *Algal Physiology and Biochemistry* (W.D.P. Stewart, ed.) Chapter 4, 124-160, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- [4] Schubert, W.D., Klukas, O., Krauß, N., Saenger, W., Fromme, P. und Witt, H.T. (1995) In *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (P. Mathis, ed.) Vol. II, pp. 3-10, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [5] Chitnis, P.R., Xu, Q., Chitnis, V.P. und Nechushtai, R. (1995) *Photosynth. Res.*, 44, 23-40
- [6] Fish, L.E., Kuck, U. und Bogorad, L. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 1413-1421
- [7] Klukas, O., Schubert, W.-D., Jordan, P., Krauß, N., Fromme, P., Witt, H.T. und Saenger W. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(11), 7351-7360
- [8] Mühlenhoff, U. (1991) Dissertation, Technische Universität Berlin
- [9] Krauß, N., Hinrichs, W., Witt, L., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K.S., Witt, H.T. und Saenger, W. (1993) *Nature* 361, 326-331
- [10] Boekema, E.J., Dekker, J.P., van Heel, M.G., Rögner, M., Saenger, W., Witt, I., Witt, H.T. (1987) *FEBS Lett.* 217, 2, 283-286
- [11] Hladik, J. und Sofrova, D. (1991) *Photosyn. Res.* 29, 171-175
- [12] Shubin, V.V., Tsuprun, V. L., Bezsmertnaya, I.N. und Karapetyan, N.V. (1993) *FEBS Lett.* 334(1), 79-82
- [13] Jekow, P., Fromme, P., Witt, H.T. und Saenger, W. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 115-120
- [14] Schubert, W.-D., Klukas, O., Krauß, N., Saenger, W., Fromme, P. und Witt, H.T. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 741-769
- [15] Golbeck, J.H. und Bryant, D.A. (1991) *Curr. Top. Bioenerg.* 16, 83-177
- [16] Lagoutte, B. und Mathis, P. (1989) *Photochem. Photobiol.* 49, 833-844
- [17] Sétif, P. (1992) In *The Photosystems: Structure, Funktion and Molecular Biology* (J. Barber, ed.) Chapter 12, pp. 471-499, Elsevier Science Publishers
- [18] Rutherford, A.W. und Heathcote, P. (1985) *Photosyn. Res.* 6, 295-316
- [19] Joliot, P. und Joliot, A. (1999) *Biochemistry* 38(34), 11130-11136
- [20] Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P. und Redding, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4437-4442

- [21] Evans, E.H., Dickons, D.P.E., Johnson, C.E., Rush, J. D. und Evans M.C.W. (1981) *Eur. J. Biochem.* 118, 81-84
- [22] Scheller, H.V., Svendsen, I. und Moller, B.L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264(12), 6929-6934
- [23] Diaz-Quintana, A., Leibl, W., Bottin, H. und Sétif, P. (1998) *Biochemistry* 37, 3429-3439
- [24] Vassiliev, I.R., Jung, Y.S., Yang, F. und Golbeck, J.H. (1998) *Biophys. J.* 74, 2029-2039
- [25] Jordan, R., Nessau, U. und Schlodder, E. (1996) Präsentation, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Universität Leipzig
- [26] Jordan, R., Nessau, U. und Schlodder, E. (1998) In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab, ed.) Vol. I, pp. 663-666, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [27] Hiyama, T. und Ke, B. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 99-108
- [28] Sakurai, H. Inoue, K., Fujii, T. und Mathis, P. (1991) *Photosynth. Res.* 27, 65-71
- [29] Mühlenhoff, U., Kruip, J., Bryant, D.A., Rögner, M., Sétif, P. und Boekema, E. (1996) *EMBO J.* 15, 488-497
- [30] Vassiliev, I.R., Jung, Y.-S., Mamdov, D., Semenov, A.Y. und Golbeck, J.H. (1997) *Biophys. J.* 72, 301-315
- [31] Vos, M.H. und Van Gorkom, H.J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 934, 293-302
- [32] Shuvalov, V.A., Klimov, V.V. und Krasnovskii, A.A. (1976) *Molek. Biol.* 10, 326-339
- [33] Ke, B. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 1552, 70-77
- [34] Ke, B., Hansen, R.E. und Beinert, H. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2941-2945
- [35] Lozoer, R., and Butler, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 460-464
- [36] Evans, M.C.W., Reeves, S.G. und Cammack, R. (1974) *FEBS Lett.* 49, 111-114
- [37] Demeter, S. und Ke, B. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 770-774
- [38] Heathcote, R., Williams-Smith, D.L., Sihra, C.K. und Evans, M.C.W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 503, 333-342
- [39] Evans, M.C.W. und Heathcote, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 590, 89, 96
- [40] Hootkins, R., Malkin, R. und Bearden, A. (1981) *FEBS Lett.* 123, 229-234
- [41] Golbeck, J.H., Parrett, K. und McDermott, A.E. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 149-160
- [42] Oh-oka, H., Itoh, S., Saeki, K., Takahashi, Y. und Matsubara, H. (1991) *Plant Cell Physiol.* 32(1), 11-17
- [43] Hanley, J.A., Kear, J., Bredenkamp, G., Li, G., Heathcote, P. und Evans, M.C.W. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1099(2), 152-156
- [44] Scott, M.P., Kjær, B., Scheller, H.V. und Golbeck, J.H. (1997) *Eur. J. Biochem.* 244, 454-461

- [45] Fromme, P. und Witt, H.T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 175-184
- [46] Norrish, R.G. und Porter, G. (1949) *Nature* 164, 658-661
- [47] Rüppel, H. und Witt, H.T. (1970) In *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, ed.) Vol. XVI, pp. 316-380, Academic Press, New York
- [48] Brettel, K. (1984) Dissertation, Technische Universität Berlin
- [49] Weil, J.A., Bolton, J.R. und Wertt, J.E. (1994) *Electron Paramagnetic Resonance* John Wiley & Sons, Inc.
- [50] Pilbrow, J.R. (1990) *Transient Ion Electron Paramagnetic Resonance* Oxford Science Publications
- [51] Carrington, A. und McLachlan, A.D. (1969) *Introduction to Magnetic Resonance* Harper and Row
- [52] Atherton, N.M. (1993) *Principles of Electron Spin Resonance* Ellis Horwood PTR Prentice Hall
- [53] Abragam, A. und Bleaney, B. (1970) *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions* Clarendon Press
- [54] Hoff, A.J. (1989) *Advanced EPR* Elsevier
- [55] Trautwein, A.X., Bill, E., Bominaar, E.L. und Winkler, H. (1991) *Structure and Bonding* 78, 1-96
- [56] Dutton, P.L. und Wilson, D.F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 346, 165-212
- [57] Cramer, W.A. und Knaff, D.B. (1989) *Energy Transduction in Biological Membranes, A Textbook of Bioenergetics* (C.R. Cantor, ed.) Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg
- [58] Rumberg, B. (1964) *Z. Naturforschg.* 19b, 707-716
- [59] Teder, A. (1973) *Acta Chem. Scand.* 27(1), 705-706
- [60] Hünig, S., Groß, J. und Schenk, W. (1973) *Liebigs Ann. Chem.* 2, 324-338
- [61] Michaelis, L. und Hill, E.S. (1933) *J. Gen. Physiol.* 16, 859-873
- [62] Wormsly, C. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 669-678
- [63] Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. und Aurell Wistrom, C. (1987) *Biochem. J.* 242, 1-10
- [64] Green, J.L. und Angell, C.A. (1989) *J. Phys. Chem.* 93, 2880-2882
- [65] Blakeley, D., Tolliday, D., Colaço, C. und Roser, B. (1990) *Lancet* 336, 854-855
- [66] Sikora, S., Little, A.S. und Dewey, T.G. (1994) *Biochemistry* 33, 4454-4459
- [67] Hagen, S.J., Hofrichter, J. und Eaton, W.A. (1996) *J. Phys. Chem.* 100, 12008-12021
- [68] Pålsson, L.-O., Flemming, C., Gobets, B., van Grondelle, R., Decker, J.P. und Schlodder, E. (1998) *Biophys. J.* 74, 2611-2622

- [69] Jordan, R. (1996) Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- [70] Ke, B., Demeter, S., Zamarav, K.I. und Khairutdinov, R.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 545, 265-284
- [71] Sonoike, K., Hatanaka, H. und Katoh, S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 52-57
- [72] Rousseau, F., Sétif, P. und Lagoutte, B. (1993) *EMBO J.* 12, 1755-1765
- [73] Sigfridsson, K., Hansson, Ö. und Brzezinski, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3458-3462
- [74] Sétif, P. und Bottin, H. (1995) *Biochemistry* 34, 9059-9070
- [75] Lelong, C., Boekema, E.J., Kruip, J., Bottin, H., Rögner, M. und Sétif, P. (1996) *EMBO J.* 15, 2160-2168
- [76] Mamedov, M.D., Gourovskaya, K.N., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H. und Sememov, A.Yu. (1998) *FEBS Lett.* 431, 219-223
- [77] Mamedova, A.A., Mamedov, M.D., Gourovskaya, K.N., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H. und Sememov, A.Yu. (1999) *FEBS Lett.* 462, 421-424
- [78] Barth, P., Lagoutte, B. und Sétif, P. (1998) *Biochemistry* 37, 16233-16241
- [79] Barth, P., Guillouard, I., Sétif, P. und Lagoutte, B. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 7030-7036
- [80] Fischer, N., Hippler, M., Sétif, P., Jacquot, J.-P. und Rochaix, J.-D. (1998) *EMBO J.* 17, 849-858
- [81] Guillouard, I., Lagoutte, B., Moal, G. und Bottin, H. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 647-653
- [82] Asada, K. und Nakano, Y (1978) *Photochem. Photobiol.* 28, 917-920
- [83] Taqui Khan, M.M. und Martell, A.E. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2165-2171
- [84] Scarpa, M., Stevanato, R., Viglino, P. und Rigo, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6695-6697
- [85] Elstner, E.F. (1990) In *Der Sauerstoff* Kapitel 1, 5-56, BI-Wiss.Verl., Mannheim; Wien; Zürich
- [86] Mehler, A.H. (1951) *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 339-351
- [87] Brettel, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 976, 246-249
- [88] Kamlowski, A. (1997) Dissertation, Technische Universität Berlin
- [89] Guigliarelle, B., Guillausier, J., More, C., Sétif, P., Bottin, H. und Bertrand, P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 900-908
- [90] Aasa, R., Bergström, J. und Vänngård, T. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 637, 118-123
- [91] Prince, R.C., Crowder, M.S. und Bearden, A.J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 592, 323-337

- [92] Brettel, K., Sieckmann, I., Fromme, P., van der Est, A. und Stehlik, D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 266-270
- [93] Cammack, R., Ryan, M.D. und Stewart, A.C. (1979) *FEBS Lett.* 107, 422-426
- [94] Teutloff, C. (1997) Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- [95] Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.H., Andrew, P.W. und Rogers, L.J. (1977) *Biochem. J.* 168, 205-209
- [96] Tagawa, K. und Arnon, D.I. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 602-613
- [97] Bottin, H. und Lagoutte, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1101(1), 48-56
- [98] Wada, K., Masui, R., Matsubara, H. und Rogers L.J. (1988) *Biochem. J.* 252(2), 571-575
- [99] Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M. und Brettel, K. (1998) *Biochemistry* 37, 9466-9476
- [100] Nienhaus, G.U. und Young, R.D. (1996)
- [101] McMahon, B.H., Muller, J.D., Wraight, C.A. und Nienhaus, G.U. (1998) *Biophys. J.* 74, 2567-2587
- [102] Sétif, P. und Brettel, K. (1993) *Biochemistry* 32(31), 7846-7854
- [103] Chamosky, S.K. und Cammack, R. (1982) *Photochem. Photobiophys.* 4, 195-200
- [104] Brettel, K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 322-373
- [105] Parrett, K.G., Mehari, T., Warren, P.G. und Golbeck, J.H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 973, 324-332
- [106] Sebban, P. (1988) *FEBS Lett.* 233, 331-334
- [107] Brettel, K. und Sétif, P. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 109-114
- [108] Warren, P.V., Golbeck, J.H. und Warden, T. (1993) *Biochemistry* 32, 849-857
- [109] Sétif, P. und Brettel, K. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 232-238
- [110] Golbeck, J.H. und Cornelius, J.M. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 849, 16-24
- [111] Golbeck, J.H., Parrett, K.G., Mehari, T., Jones, K.L. und Brand, J.J. (1988) *FEBS Lett.* 228, 268-272
- [112] Lüneberg, J., Fromme, P., Jekow, P. und Schlodder, E. (1994) *FEBS Lett.* 338, 197-202
- [113] Brettel, K. und Golbeck, J.H. (1995) *Photosynth. Res.* 445, 183-193
- [114] Marcus, R.A. und Sutin, N. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 811, 265-322
- [115] Moser, C.C., Keske, J.M., Warncke, K., Farid, R.S. und Dutton, P.L. (1992) *Nature* 355, 796-802
- [116] Bittl, R. und Zech, S. (1997) *J. Phys. Chem.* 101, 1429-1436
- [117] Schubert, W.-D. (1997) Dissertation, Freie Universität Berlin
- [118] Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X. und Dutton, P.L. (1999) *Nature* 402, 47-52



- [119] Webber, A.N., Su, H., Bingham, S.E., Käß, H., Krabben, L., Kuhn, M., Jordan, R., Schlodder, E. und Lubitz, W. (1996) *Biochemistry* 35, 12857-12863
- [120] Krabben, L., Schlodder, S., Jordan, R., Carbonera, C., Giacometti, G., Lee, H., Webber, A.N. und Lubitz, W. (2000) *Biochemistry* 39, 13012-13025
- [121] Schulz, C., Müh, F., Beyer, A., Jordan, R., Schlodder, E. und Lubitz, W. (1998) In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab, ed.) Vol. II, pp. 767-770, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [122] Watanabe, T. und Kobayashi, M. (1991) In *Chlorophylls* (H. Scheer, ed.) pp. 287-303, CRC Press, Boca Raton
- [123] Schubert, W.-D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H.T., Fromme, P. und Krauß, N. (1998) *J. Mol. Biol.* 280, 297-314
- [124] McDowell, L.M., Gaul, D., Kirmaier, C., Holten, D. und Schenk, C.C. (1991) *Biochemistry* 30, 8315-8322
- [125] Goldsmith, J.O., King, B. und Boxer, S.G. (1996) *Biochemistry* 35, 2421-2428
- [126] Moss, D., Nbedryk, E., Breton, J. und Mäntele, W. (1990) *FEBS Lett.* 187, 565-572
- [127] Allen, J.P., Artz, K., Lin, X., Williams, J.C., Ivancich, A., Albouny, D., Mattioli, T.A., Fetsch, A., Kuhn, M. und Lubitz, W. (1996) *Biochemistry* 35, 6612-6619
- [128] Nbedryk, E., Schulz, C., Müh, F., Lubitz, W. und Breton, J. (2000) *Photochem. Photobiol.* 71, 582-588
- [129] Fromme, P. (1998) Habilitationsschrift, Technische Universität Berlin
- [130] Schlodder, E., Brettel, K., Schatz, G.H. und Witt, H.T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 178-185
- [131] Zouni, A., Jordan, R., Schlodder, E., Fromme, P. und Witt, H.T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 103-105
- [132] Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W. und Orth, P. (2001) *Nature* 409, 739-743.

## Danksagung

Eberhard Schlodder danke ich für die umfangreiche Diskussion meiner Dissertation und die jahrelange Begleitung meiner wissenschaftlichen Arbeiten.

Herr Prof. Dr. Wolfgang Lubitz hat sich trotz der anstrengenden Zeit des Umzugs nach Mühlheim die Zeit genommen, Bericht für diese Arbeit zu sein.

Dem Arbeitskreis Fromme/Witt danke ich für die Bereitstellung der von mir benötigten PS I Teilchen.

Nur mit der zeitaufwendigen Unterstützung von Christian Teutloff, Monika Fahnenschmidt und Andreas Kamlowski war es mir möglich, die EPR-Messungen für diese Arbeit durchzuführen. Christian danke ich zusätzlich für das Korrekturlesen des EPR-Kapitels.

Klaus Irrgang war allzeit bereit, mir geduldig den biochemischen Sachverhalt nahezubringen.

Mit Herrn Prof. Dr. Witt habe ich eine kurze, aber sehr motivierende und angenehme Forschungszeit verbracht.

Mit Ersatzteilen und informativen Hilfestellungen für die Optimierung der Oettle-Zelle haben uns Ulrike Kaiser und Eveline Hamacher von der Universität Erlangen unterstützt.

Für die zügige Anfertigung und Reparatur diverser technischer Objekte waren Herr Borchart, Herr Richter, Herr vom Hagen und Herr Wenzel zur Stelle.

Prof. Dr. Schomäcker hat mich freundlicherweise das letzte Jahr als wissenschaftlicher Mitarbeiter beschäftigt, ohne viel Gegenleistungen zu erwarten. Er hat so meine Familie und mich finanziell abgesichert. Friedhelm Lenzian danke ich für die Information, daß es diese Stelle überhaupt gab!

Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Max-Volmer-Instituts danke ich für das gute Arbeitsklima.

Bertram Hanssum, Helmut Hartmann, Irene Geisenheimer und Matthias Stein haben mich sehr unterstützt, indem sie die Arbeit korrektur gelesen haben.

Einen ganz besonderen Dank an Irene und Amina Lucia, die gerade in der Endphase meiner Arbeit viel auf mich verzichten mußten und so manche angespannte Situation hingenommen haben.

# Lebenslauf

Name: Rafael Jordan  
Geburtsdatum: 03.04.70 in Berlin

## Ausbildung

1976-1982	Grundschule in Berlin
1982-1989	Tannenberg Oberschule (Gymnasium, jetzige Willi Graf Oberschule) in Berlin
Jun. 1989	Abitur
Okt. 1989-Jan. 1996	Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin
Jan. 1996	Diplom in Chemie
Feb. 1996	Beginn der Dissertation an der Technischen Universität Berlin

## Tätigkeiten

Feb. 1996 - Dez. 1999	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Volmer-Institut für Biochemie und Biophysikalische Chemie der Technischen Universität Berlin
Okt. 1999-Mär. 2000	Lehrauftrag im Grundpraktikum der Physikalischen Chemie (PCI) an der Technischen Universität Berlin
Mai. 2000 - Mai. 2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter mit Lehraufgaben am Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Berlin